

Gaschromatographische Untersuchung von
ALLOPURINOL und BENZBROMARON
und ihr Nachweis in
biologischem Material

Hermann Widmann

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548325_0041

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität
München

Direktor: Prof. Dr. W. Spann

Gaschromatographische Untersuchung von ALLOPURINOL
und BENZBROMARON und ihr Nachweis in biologischem
Material

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hermann Widmann

aus
Ingelstadt

Jahr

1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Spann

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 7. 81



Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Anwendung von Allopurinol und Benz- bromaron in der Medizin	1
1.2	Pharmakologische Wirkungsweise	2
2	Chemische Eigenschaften, Metabolismus und Pharmakokinetik der beiden Arznei- mittel	5
2.1	Allopurinol	5
2.1.1	Chemische Eigenschaften	5
2.1.2	Metabolismus	7
2.1.3	Pharmakokinetik	9
2.2	Benzbromaron	13
2.2.1	Chemische Eigenschaften	13
2.2.2	Metabolismus	15
2.2.3	Pharmakokinetik	18
3	Nachweismethoden, die in der Lite- ratur beschrieben sind	20
3.1	Allopurinol	20
3.1.1	Verfahren zur Gruppentrennung und Anreicherung	
3.1.1.1	Trennung durch Extraktion	20
3.1.1.2	Aufbereitung von Urin und Blut	20
3.1.1.3	Fraktionierte Abtrennung mit Säulen	22
3.1.1.4	Trennung durch Dünnschichtchromato- graphie bzw. Papierchromatographie	24

3.1.2	Verfahren zum Nachweis und zur Identifikation	25
3.1.2.1	Dünnschichtchromatographie	25
3.1.2.2	Papierchromatographie	26
3.1.2.3	Qualitative Spektrophotometrie	26
3.1.2.4	Quantitative Spektrophotometrie	27
3.1.2.5	Massenspektrometrie	28
3.1.2.6	Polarographische Meßmethode	29
3.1.2.7	Hochdruckflüssigchromatographie	29
3.1.2.8	Gaschromatographie	32
3.1.2.9	Indirekter, enzymatischer Nachweis durch Hemmung der Xanthinoxidase	33
3.2	Benzbromaron	35
3.2.1	Verfahren zur Gruppentrennung und Anreicherung	35
3.2.1.1	Extraktionsverfahren	35
3.2.1.2	Dünnschichtchromatographisches Trennverfahren	35
3.2.1.3	Hydrolyse	36
3.2.2	Nachweis- und Identifikationsmethoden	37
3.2.2.1	Dünnschichtchromatographie	37
3.2.2.2	Qualitative Spektrophotometrie	38
3.2.2.3	Quantitative Spektrophotometrie	38
3.2.2.4	Gaschromatographie	39
3.3	Zusammenfassung der Literaturüber- sicht	40
3.3.1	Allopurinol	40
3.3.2	Benzbromaron	41
3.3.3	Aufgabenstellung	42

4	Eigene Versuche zum gaschromato- graphischen Nachweis der beiden Medikamente	43
4.1	Allopurinol	43
4.1.1	Untersuchung underivatisierter Substanzen	43
4.1.1.1	Allopurinol	43
4.1.1.2	Versuche mit gelösten Strukturana- logen von Allopurinol	45
4.1.2	Derivatisiertes Allopurinol	46
4.1.2.1	Propionylierung in alkalischem Milieu	46
4.1.2.2	Propionylierung in Pyridin	47
4.1.2.3	Propionylierung in Triäthylamin	48
4.1.2.4	Chlorieren mit Thionylchlorid	48
4.1.2.5	Derivatisierung mit Pentafluor- propionsäure	49
4.1.3	Silylierung von Allopurinol	50
4.1.4	Versuche zur Isolierung von Allo- purinol aus Urin	53
4.2	Benzbromaron	54
4.2.1	Versuche mit nicht derivatisiertem Benzbromaron	54
4.2.2	Derivatisierung von Benzbromaron	57
4.2.2.1	Propionylierung in alkalischem Milieu	57
4.2.2.2	Propionylierung in Pyridin	61
4.2.3	Einführung eines inneren Standards	62
4.2.3.1	Untersuchung von nicht derivatisier- tem Phenprocoumon	62
4.2.3.2	Untersuchung von propionyliertem Phenprocoumon	63
4.2.3.3	Untersuchung der Retentionszeiten	65
4.2.3.4	Aufstellen einer Eichkurve	65
4.2.4	Benzaron	67

4.2.5	Versuche zur Abtrennung aus Urin	68
4.2.5.1	Direkte Verarbeitung des Urins	68
4.2.5.2	Abtrennung mit XAD 2 Säulchen	68
4.2.5.3	Saure Hydrolyse etwaiger Glukuron- verbindungen	69
4.2.6	Versuche zur Abtrennung aus Blut	69
4.2.6.1	Extraktion durch Ausschütteln	70
4.2.6.2	Ausschütteln des Extraktes in ver- dünnte Natronlauge	71
4.2.6.3	Extraktionsverfahren mit Extrelut- säulchen	72
4.2.6.4	Ultrafiltration	73
4.2.6.5	Eichreihe für Benzbromaron in Blut	73
4.2.7	Nachweis in Urin	75
4.2.7.1	Nachweis von nicht glukuronidiertem Benzbromaron	76
4.2.7.2	Nachweis von glukuronidiertem Benz- bromaron	76
4.2.8	Nachweis in Blut	78
4.2.8.1	Gaschromatographischer Nachweis	78
4.2.8.2	Massenspektrometrischer Nachweis	80
4.2.9	Arbeitsvorschrift	85
4.2.9.1	Untersuchung von Blut	85
4.2.9.2	Untersuchung von Urin	86
5	Diskussion der Ergebnisse und Zu- sammenfassung	88
5.1	Allopurinol	88
5.2	Benzbromaron	89
5.3	Zusammenfassung	91
6	Literaturübersicht	94

1. Einführung

1.1 Anwendung von Allopurinol und Benzbromaron in der Medizin

Die wichtigste Indikation zur Anwendung der beiden Pharmaka Allopurinol und Benzbromaron ist die chronische primäre Gicht (Hyperurikämie). Diese gehört heute gemeinsam mit Diabetes Mellitus und verschiedenen Hyperlipidämien zu den volksgesundheitlich bedeutsamen Stoffwechselerkrankungen des erwachsenen Menschen. Die Häufigkeit wird mit 4,5 bis 12 % der Allgemeinbevölkerung angegeben (Zöllner, Gröbner, 39). Die Ursache wird in einer erhöhten Produktion oder in einer verminderten Ausscheidung der Harnsäure gesehen. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Zusätzliche Bedeutung kommt alimentären Faktoren zu. Die Gicht ist in Notzeiten selten, gewinnt aber in unserer heutigen Überflußgesellschaft immer mehr an Bedeutung.

Weitere Indikationen stellen die sekundären Hyperurikämien dar. Sie kommen bei chronisch verlaufenden Blutkrankheiten mit gesteigertem Zellumsatz (Polycythämia vera, myeloische Metaplasie, chronische myeloische Leukämie), bei gesteigertem Zelluntergang (schwere Infektionen, Vergiftungen, Herzinfarkt, Hungerperioden, Erythrozytenuntergang bei Neugeborenen) und bei iatrogenen Maßnahmen (Verabreichung von Saluretika, Zytostatika, radiologische Therapie, Nulldiät) vor (Mertz, 23; Zöllner, Gröbner, 39).

1.2 Pharmakologische Wirkungsweise

Die Wirkungen beider Medikamente sind verschieden. Allopurinol ist ein Urikostatikum. Als Strukturanalogon der Harnsäurevorstufe Hypoxanthin hemmt es dessen Synthese auf mehrfachen Wegen:

1. Es wird zu einem falschen Nucleotid unter Verbrauch von Phosphoribosyl - 1 - Pyrophosphat (PRPP) aufgebaut und entzieht zweiteres damit der Harnsäuresynthese.
2. Das falsche Nucleotid hemmt die Glutamin - Phosphoribosyl - Amidotransferase. Dies bedeutet eine Herabsetzung der Neusynthese am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.
3. Das falsche Nucleotid hemmt die Hypoxanthin - Guanin - Phosphoribosyl - Transferase und die Adenin - Phosphoribosyl - Transferase (HG - PRT und A - PRT).
4. Allopurinol hemmt direkt die Xanthinoxidase.

Der Harnsäurespiegel im Blut wird also dadurch gesenkt, daß die Synthese der Harnsäure vermindert wird und statt dessen schon die Vorstufen, hauptsächlich Hypoxanthin und Xanthin, ausgeschieden werden. Siehe auch Abb. 1.1. Dadurch vermindert sich auch die Gefahr der Steinbildung in Niere und ableitenden Harnwegen.

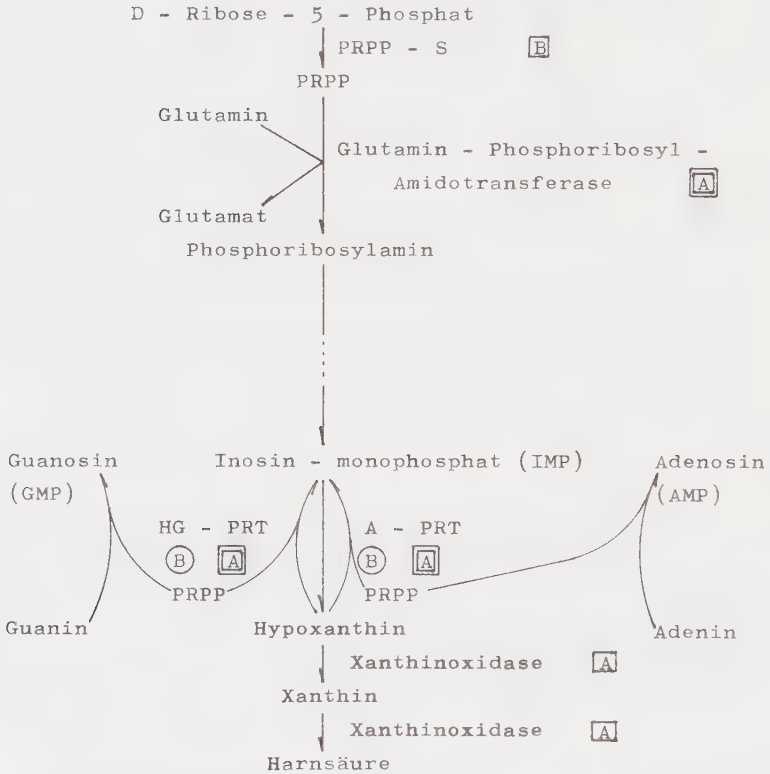
Im Gegensatz dazu ist Benzbromaron in erster Linie ein Urikosurikum. Es senkt den Uratspiegel im Blut hauptsächlich durch vermehrte Ausscheidung im Urin. Die Harnsäure wird in den Glomeruli filtriert, in den Tubuli sezerniert und reabsorbiert. Die Absorption überwiegt die Sekretion bei weitem. Durch die medikamentöse Hemmung der tubulären Mechanismen ist erstere deshalb viel

stärker betroffen. Eine weitere Wirkung ist eine verstärkte enterale Ausscheidung. Darüberhinaus hemmt Benzbromaron auch die Purinsynthese, und zwar durch:

1. Aktivierung von HG - PRT und A - PRT.
2. Hemmung der Phosphoribosylpyrophosphat - Synthetase (PRPP - S) und damit Senkung von PRPP.

Siehe auch Abb. 1.1

Abb. 1.1: Schema der Harnsäuresynthese und der Einwirkung von Allopurinol und Benzbromaron (verändert nach Löffler, 22 und Müller et al., 27)



A Allopurinol

B Benzbromaron

(A) (B) Aktivierung

[A] [B] Hemmung

[A] indirekte Hemmung durch falsches Nukleotid

2. Chemische Eigenschaften, Metabolismus und Pharmakokinetik der beiden Arzneimittel

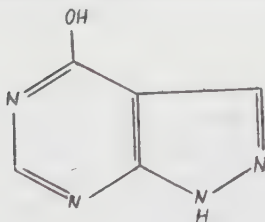
2.1 Allopurinol

2.1.1 Chemische Eigenschaften

Die Daten wurden Mitteilungen der Firmen Desitin (8) und Henning (16) sowie dem British Pharmacopeia (29) und dem United States Pharmacopeia (30) entnommen.

Allopurinol gehört zur Gruppe der Pyrazolopyrimidine. Die genaue Bezeichnung lautet: 1 H - Pyrazolo 3,4 - d - Pyrimidin - 4 - ol. Ein anderer Name: Allohypoxanthin.

Abb. 2.1: Strukturformel von Allopurinol



Summenformel: $C_5 H_4 N_4 O$

Molekulargewicht: 136,1

Prozentuale Zusammensetzung:	Kohlenstoff	44,13 %
	Wasserstoff	2,96 %
	Stickstoff	41,16 %
	Sauerstoff	11,95 %

Beschreibung der Reinsubstanz: Allopurinol ist ein weißes bis fast weißes, mikrokristallines, etwas flockiges Pulver. Es ist praktisch geschmacklos und geruchlos.

Schmelzpunkt: über 350°C

Löslichkeit:

praktisch unlöslich in Chloroform, Äthylmethylketon, Toluol, Triäthylamin, Äther.

sehr schlecht löslich in Wasser, Äthanol, Äthylacetat.

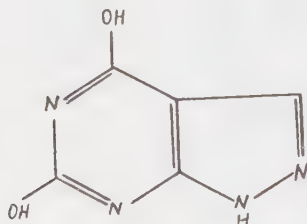
schlecht löslich in Aceton.

löslich in Dimethylformamid.

gut löslich in alkalischer NaHCO_3 - Lösung.

Der Hauptmetabolit von Allopurinol, das Oxypurinol oder Alloxanthin, hat folgende Strukturformel:

Abb. 2.2:



2.1.2 Metabolismus

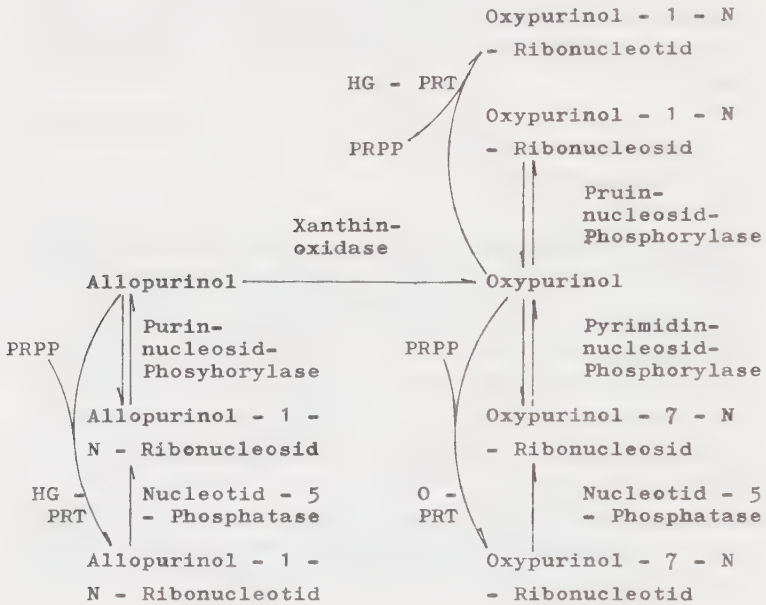
Bei der Clearance des Hypoxanthinanalogen Allopurinol aus dem Blutkreislauf spielen folgende beiden Prozesse eine Rolle:

- a) renale Ausscheidung
- b) Metabolisierung

Die wichtigste Metabolisation in vivo ist die Umwandlung durch die Xanthinoxidase zum entsprechenden Xanthinanalogen Oxypurinol (Elion, 10). Krenitzky et al. (20) fanden, daß etwa 45 - 65 % der verabreichten Allopurinoldosis auf diese Weise oxidiert wird. Ein geringer Teil wird durch die Purinnucleosid - Phosphorylase mit Ribose - 1 - Phosphat direkt zu Allopurinol - 1 - N - Ribonucleosid und vermutlich durch die HG - PRT (siehe Abschnitt 1.2) zu Allopurinol - 1 - N - Ribonucleotid umgewandelt. Die beiden Metaboliten konnten nur in Urin nachgewiesen werden.

Der weitaus größte Teil des Oxypurinols wird als solches unverändert renal ausgeschieden. Ein geringer Anteil wird durch die Pyrimidinnucleosid - Phosphorylase zu Oxypurinol - 7 - N - Ribonucleosid und durch die Purinnucleosid - Phosphorylase auch zu Oxypurinol - 1 - N - Ribonucleosid umgewandelt (Elion et al., 13). Oxypurinol - 7 - N - Ribonucleotid wird direkt durch die O - PRT gebildet, Oxypurinol - 1 - N - Ribonucleotid vermutlich durch die HG - PRT (Beardmore und Kelley 4). Nach Bildung von Oxypurinol - 7 - N - Ribonucleotid durch die O - PRT scheint es durch die Nucleotid - 5 - Phosphatase zur Bildung von Oxypurinol - 7 - N - Ribonucleosid zu kommen, das dann beim Menschen ausgeschieden wird (Krenitzky et al., 20).

Abb. 2.3: Metabolismus von Allopurinol (Kaiser, 17)



In Isotopenstudien mit 6 - ^{14}C - Allopurinol wird bis zu 20 % der verabreichten Radioaktivität nicht im Urin wiedergefunden. Simmonds (35) vermutete deshalb, daß ein Teil des Allopurinols im menschlichen Körper eingebaut wird und dort verbleibt.

Elion et al. (11) konnten innerhalb 48 Stunden nach oraler Verabreichung 19,9 % des ^{14}C - Anteils im Faeces wiederfinden. Sie betrachteten dies als nicht resorbierten Anteil des Medikaments.

2.1.3 Pharmakokinetik

Allopurinol wird schnell aus dem Darm resorbiert. Es hat eine Halbwertszeit im Serum von etwa 2 - 3 Stunden (Elion et al., 11). Im Urin werden etwa 3 - 10 % in 24 Stunden unverändert ausgeschieden. Krenitzky et al. (20) fanden etwa 70 % der verabreichten Allopurinoldosis als Oxypurinol, einen geringen Teil als Allopurinol - 1 - N - Ribonucleosid im Urin.

Bei intravenöser Gabe einer Einzeldosis von $140 \mu\text{g } ^{14}\text{C}$ - Allopurinol als Natriumsalzlösung fanden Elion et al. (11) im Plasma während der initialen 8 Stunden für das verabreichte ^{14}C eine Halbwertszeit von 8 Stunden, danach erhöhte sie sich auf 16 Stunden. Der anfängliche Plasmaspiegel erreichte eine Konzentration von $4,5 \mu\text{g/ml}$. Die Aufschlüsselung der Radioaktivität ergab, daß nach 1 Stunde 65 % derselben im Plasma in der Oxypurinolfraktion nachzuweisen war, nach 2 Stunden 85 %, nach 6 Stunden 100 %. Demzufolge wäre die Clearance von Allopurinol aus dem Plasma bei einmaliger intravenöser Gabe nach 6 Stunden durch Oxydation und renale Ausscheidung abgeschlossen. Die Gesamtausscheidung von ^{14}C im Urin betrug nach einer Stunde 8,2 %, nach 2 Stunden 14 %, nach 6 Stunden 38 %, nach 24 Stunden 47,5 % der verabreichten Dosis. Bei Fraktionierung waren nach einer Stunde 43 %, nach 2 Stunden 15 % der Radioaktivität im Allopurinol, nach 12 Stunden die gesamte Radioaktivität im Oxypurinol nachzuweisen.

Bei oraler Gabe von 169 mg ^{14}C - Allopurinol konnte nach 30 Minuten noch keine Radioaktivität im Plasma gefunden werden. Nach 1 Stunde entsprach die Radioaktivität im Plasma einer Konzentration von 2,2 $\mu\text{g/ml}$. Nach 2 - 6 Stunden wurde ein Plateau erreicht, danach fiel sie langsam ab, innerhalb von 48 Stunden auf 1 $\mu\text{g/ml}$ (Oxypurinol). Das Maximum der Urinexkretion war nach 2 - 3 Stunden erreicht. Nach 6 Stunden konnte die gesamte ausgeschiedene Radioaktivität in der Oxypurinolfraction nachgewiesen werden. Die kumulative ^{14}C - Ausscheidung im Urin war nach 6 Stunden 9,5 %, nach 24 Stunden 25 %, nach 48 Stunden 38,5 %. Die Halbwertszeit für Oxypurinol im Plasma wurde auf 28 Stunden berechnet.

Elion und Nelson (12) fanden nach einer Einzeldosis von 300 mg beim Menschen nach 1 - 3 Stunden einen Allopurinolspiegel im Plasma von weniger als 1,4 $\mu\text{g/ml}$, nach 6 Stunden war Allopurinol nicht mehr nachweisbar. Der Oxypurinolplasmaspiegel betrug etwa 9,9 $\mu\text{g/ml}$.

Elion et al. (11) und Rundless et al. (32) konnten keine wesentliche Serumproteinbindung von Allopurinol oder Oxypurinol feststellen.

Brown und Bye (6) erstellten ein Plasmaspiegelprofil über 24 Stunden nach einmaliger oraler Verabreichung von 300 mg Allopurinol. Die Konzentration erreichte 30 Minuten nach Einnahme einen Wert von 1,6 $\mu\text{g/ml}$, nach einer Stunde 1,2 $\mu\text{g/ml}$, nach 2 Stunden 0,95 $\mu\text{g/ml}$, nach 4 Stunden 0,5 $\mu\text{g/ml}$, nach 6 Stunden 0,15 $\mu\text{g/ml}$, nach 8 Stunden 0,03 $\mu\text{g/ml}$ und nach 12 Stunden 0.

Der Oxypurinolwert war nach einer Stunde 5,5 $\mu\text{g/ml}$, nach 2 Stunden 5,8, nach 4 Stunden ein Maximum von 6,1, nach 6 Stunden 5,5, nach 8 Stunden 4,7, nach 12 Stunden 4,3, nach 24 Stunden 3,7 $\mu\text{g/ml}$.

Auch Hande et al. (15) untersuchten die Serumspiegel von Allopurinol und Oxypurinol nach Verabreichung des Medikaments.

Intravenöse Applikation: 8 Patienten wurden Dosen zwischen 100 und 300 mg Allopurinol injiziert (1,1 - 5,3 mg/kg Körpergewicht). Zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 30 Minuten und 24 Stunden post injectionem wurden Blutproben gesammelt und deren Allopurinol- bzw. Oxypurinolspiegel bestimmt:

- a) Allopurinolserumkonzentration: Die Maximalwerte lagen zwischen 0,4 und 4 $\mu\text{g/ml}$ je nach Applikationsmenge. Sie nahmen schnell ab und waren 3 bis spätestens 6 Stunden nach der Injektion unter die Nachweisgrenze gefallen.
- b) Die maximalen Serumkonzentrationen von Oxypurinol waren 3 Stunden nach der Allopurinolinjektion erreicht. Für Dosen von 4 und 5 mg/kg Körpergewicht betrug der Wert 1,5 - 3,0 $\mu\text{g/ml}$.

Die Halbwertszeit der Plasmakonzentration war für Allopurinol $39 \pm 8,4$ Minuten, für Oxypurinol $13,5 \pm 7,6$ Stunden.

Orale Verabreichung: 5 Patienten erhielten je eine Dosis von 300 mg Allopurinol (3,8 - 6,7 mg/kg Körpergewicht). Die Spitzenwerte der Allopurinolkonzentrationen wurden innerhalb der ersten Stunde erreicht: 1,35 - 4 µg/ml Serum. Sie fielen bis zur 12. Stunde auf etwa 0,13 µg/ml ab.

Die Oxypurinolserumspiegel erreichten 2 - 3 Stunden nach Verabreichung die Maximalwerte (0,8 - 4,5 µg/ml) und waren jenen bei venöser Applikation vergleichbar. Die hier erzielte Halbwertszeit betrug $13,8 \pm 2,8$ Stunden.

Zusätzlich wurde noch eine Serumspiegelbestimmung bei Patienten mit Dauermedikation durchgeführt. Die Tagesdosis von 300 mg Allopurinol, oral zugeführt, wurde in einem bzw. 3 Teilen verabreicht. Die Blutproben wurden 24 bzw. 4 Stunden nach Applikation entnommen.

Der Allopurinolspiegel variierte je nach Patient, während sich der Oxypurinolspiegel ziemlich konstant einstellt, durchschnittlich bei 4,5 µg/ml (zwischen 1,35 und 13,5 µg/ml). Für die Initialdosis war die Halbwertszeit von Allopurinol 40 ± 6 Minuten, bei Dauertherapie 43 ± 11 Minuten.

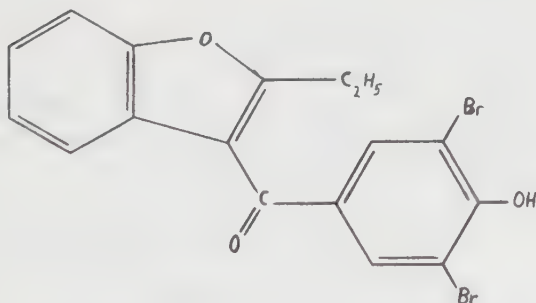
2.2 Benzbromaron

2.2.1 Chemische Eigenschaften

Die Angaben wurden einer Mitteilung der Firma Labaz (21) sowie dem Deutschen Arzneimittelcodex (2) entnommen.

Benzbromaron gehört zur Gruppe der Benzofurane. Die genaue chemische Bezeichnung lautet: (2 - Aethyl - benzofuran - 3 - yl) - (3,5 - dibrom - 4 - hydroxyphenyl) - keton.

Abb. 2.4: Strukturformel von Benzbromaron



Summenformel: $C_{17} H_{12} O_3 Br_2$

Molekulargewicht: 424,1

Prozentuelle Zusammensetzung:	Kohlenstoff	48,14 %
	Wasserstoff	2,85 %
	Sauerstoff	11,32 %
	Brom	37,69 %

Beschreibung der Reinsubstanz: Benzbromaron ist ein feines, kristallines Pulver weißer, sehr schwach gelber Farbe. Es ist praktisch geruchlos, der Geschmack ist herb, beißend.

Schmelzintervall: 149 - 153° C (Kapillarmethode nach dem europäischen Arzneibuch, 1)

Löslichkeit:

praktisch unlöslich in Wasser

sehr wenig löslich in NaOH - Normallösung

schwer löslich in Äthanol, Isopropanol

löslich in Äther, Cyclohexan

gut löslich in Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff,

Dimethylformamid, Dioxan, Äthylacetat, Aceton.

Die beiden bekannten Metaboliten von Benzbromaron sind seine dehalogenierten Formen Brombenzaron und Benzaron. Sie haben folgende Strukturformeln:

Abb. 2.5: Brombenzaron

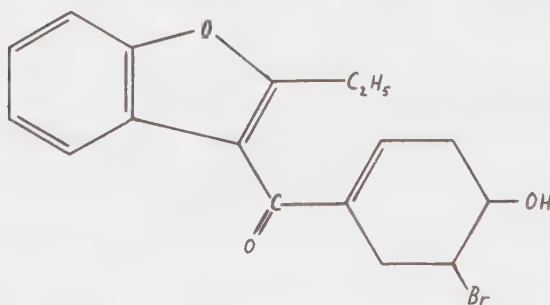
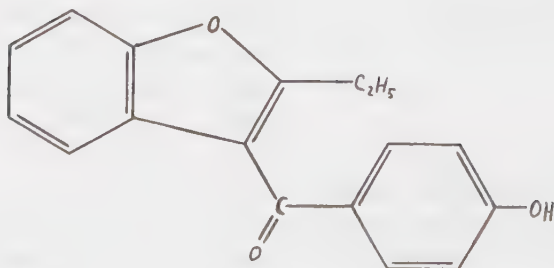


Abb. 2.6: Benzaron



2.2.2 Metabolismus

Die Elimination von Benzbromaron aus dem menschlichen Körper nach oraler Verabreichung wird durch folgende Mechanismen bewirkt:

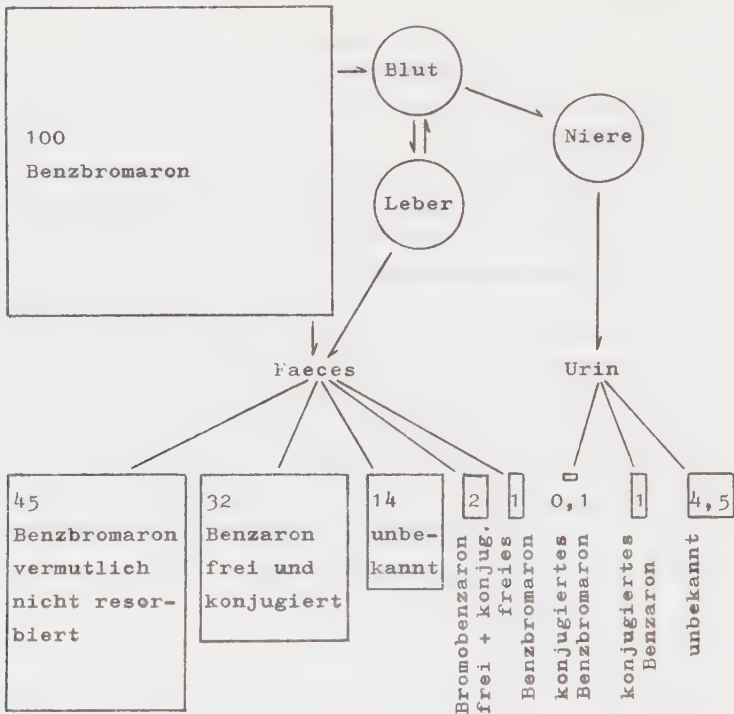
- a) renale Ausscheidung
- b) fäkale Ausscheidung
- c) Metabolismus

In der Untersuchung von Broekhuysen et al. (5) mit Tritium-markiertem Benzbromaron konnten verschiedene Stoffwechselprodukte nachgewiesen werden. Der wichtigste Metabolit ist die dehalogenierte Form, das Benzaron. Außerdem wird auch eine monodehalogenierte Form, das Bromobenzaron, und mindestens 3 nicht identifizierete, unbekannte Substanzen gebildet, von denen 2 mit Äther extrahierbar sind und dünnschichtchromatographisch in 2 Fraktionen getrennt werden können. Die Abb. 2.7 nach Broekhuysen et al. (5) zeigt die einzelnen Fraktionen der Gesamtausscheidung nach einmaliger oraler Verabreichung von 100 mg Benzbromaron.

Metaboliten im Faeces:

Im Faeces wurde innerhalb von 10 Tagen 91 % der verabreichten einmaligen Dosis von 100 mg ausgeschieden, 50 % (der Gesamtmenge) unverändert als Benzbromaron und 41 % als Metaboliten. Diese sind Bromobenzaron (1 %), Benzaron (16,5 %), und wenigstens 2 nicht identifizierte Verbindungen, von denen 6 % mit Äther extrahierbar und 17,5 % in Äther nicht löslich sind.

Abb. 2.7: Gesamtausscheidung nach einmaliger oraler Verabreichung von 100 mg Benzbromaron nach Broekhuysen et al. (5).



Metaboliten im Urin:

Im Urin wurden mindestens 5 radioaktive Verbindungen gefunden. Bei den meisten war eine vorausgehende Hydrolyse der Glukuronidverbindungen nötig, um die Extrahierbarkeit mit Äther zu verbessern. Die Gesamtausscheidung im Urin betrug etwa 8 - 9 % der applizierten Dosis. 73 % davon waren mit Äther nicht extrahierbar.

bar, der Anteil von Benzbromaron betrug 2 %, der von Benzaron 18 %, der von den beiden nicht identifizierten, mit Äther extrahierbaren Substanzen 5 % und 3 %.

Metaboliten in der Galle:

Die Untersuchungen wurden 5 Tage lang nach einer einzelnen oralen Dosis von 100 mg Benzbromaron durchgeführt, die Proben über eine Kehrdrainage gewonnen. Innerhalb dieser Zeit wurden 6 % der Gesamtdosis im Urin, 27 % in Faeces und 49 % in der Galle wiedergefunden. Der mit Äther extrahierbare Anteil der Radioaktivität in der Galle sank von anfänglich 62 % bis zum 5. Tag auf 25 %.

Die von der 12. bis zur 18. Stunde nach Verabreichung gesammelte Galle enthielt 11,1 % der Gesamtdosis. Davon waren 51 % mit Äther extrahierbar. Die Fraktionierung ergab für Benzaron 87,5 % und für eine unbekannte Substanz 6,1 %. Nach Hydrolyse mit Glukuronidase erreichte der mit Äther extrahierbare Anteil 74 % der Radioaktivität. Hiervon waren 1,5 % Benzbromaron, 3,6 % Bromobenzaron, 86,5 % Benzaron und 7,3 % zwei nicht identifizierte Substanzen. Die Werte zeigten, daß etwa die Hälfte der nicht extrahierbaren radioaktiven Stoffe in der Galle glukuronidiertes Benzaron war. Die Autoren vermuteten, daß Benzbromaron in der Leber dehalogeniert und das verbleibende Benzaron dort anschließend teilweise glukuronidiert wird.

2.2.3 Pharmakokinetik

Nach Broekhuysen et al. (5) scheint Benzbromaron nur langsam aus dem Verdauungstrakt resorbiert zu werden. Die maximalen Blutspiegel werden etwa 5 - 6 Stunden nach oraler Verabreichung einer einzelnen Dosis von 100 mg erreicht. Die Blutradoaktivität in μg Benzbromaron umgerechnet betrug bei 8 Probanden im Mittel nach 2 Stunden 0,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blut, nach 4 Stunden 1,1, nach 5 Stunden 1,5, nach 6 Stunden 1,3, nach 8 Stunden 1,3, nach 12 Stunden 1,0, nach 24 Stunden 0,9, nach 48 Stunden 0,9, nach 72 Stunden 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blut. Der Benzbromaronanteil war anfangs über 50 % und sank in 48 Stunden auf 15 % der Radioaktivität, während der Benzaronanteil im gleichen Zeitraum von 15 % auf 75 % anstieg. Während der Plateauphase, die sich nach dem Blutspiegelmaximum bis 48 Stunden nach Medikamenteeinnahme erstreckte, wurde Benzbromaron durch Benzaron ersetzt. Das in der Leber dehalogenierte Benzaron wird in einem enterohepatischen Kreislauf wieder ins Blut zurückgewonnen.

Der Blutspiegel des zweiten Metaboliten Bromobenzaron blieb immer sehr gering.

Yu (38) verwendete ein gaschromatographisches Bestimmungsverfahren. Er fand bereits 2 Stunden nach oraler Verabreichung einen maximalen Serumspiegel von Benzbromaron. Nach Einnahme von 40 mg des Medikaments wurden 1,21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gemessen. Nach 4 Stunden war der Durchschnittswert 0,67, nach 6 Stunden 0,45, nach 12 Stunden 0,18, nach 24 Stunden 0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Serum. Bei 2 von 9 Probanden konnte das Medikament erst nach 4 Stunden, bei einem erst nach 8 Stunden nachgewiesen werden. Hier wurden niedrigere Konzentrationen gefunden.

2 Probanden nahmen 80 mg Benzbromaron oral ein. Bei ihnen wurde nach 2 Stunden eine Maximalkonzentration von 2,27 bzw. 2,53 $\mu\text{g/ml}$ Serum gemessen. Die Werte verringerten sich etwa in der gleichen Relation wie oben beschrieben.

Die Bestimmung der Konzentrationen der Metaboliten Benzaron und Brombenzaron wurde nur bei einem Patienten durchgeführt. Benzaron konnte in hohen Werten nachgewiesen werden. Das Ergebnis 2 Stunden nach Verabreichung von 40 mg Benzbromaron war 1,3 $\mu\text{g/ml}$, nach 4 Stunden 5,6, nach 6 Stunden 5,3, nach 8 Stunden 3,75, nach 10 Stunden 3,1, nach 12 Stunden 2,7 $\mu\text{g/ml}$ Serum, nach 24 Stunden 0. Brombenzaron erreichte nach 4 Stunden bis nach 24 Stunden ein Plateau von etwa 1,4 $\mu\text{g/ml}$ Serum.

Die Menge der Maximalkonzentration des Benzbromaron zeigt nicht die wahre Resorption aus dem Intestinaltrakt an, sondern ist ein Zeichen des schnellen Metabolismus in der Leber.

Bei regelmäßiger oraler Verabreichung von 100 mg Benzbromaron konnten Broekhuysen et al. (5) einen Blutspiegel von etwa 3 $\mu\text{g/ml}$ bestimmen. Die gemessene Radioaktivität ist hier in Benzbromaron umgerechnet, obwohl auch die Metaboliten erfaßt sind.

Nach Broekhuysen et al. (5) erfolgt die Ausscheidung von Benzbromaron hauptsächlich enteral via Leber und Galle. Etwa 8 - 9 % der verabreichten Menge wird renal eliminiert. Bei regelmäßiger Einnahme steigt dieser Anteil auf 15 - 20 %.

3. Nachweismethoden, die in der Literatur beschrieben sind.

3.1 Allopurinol

3.1.1 Verfahren zur Gruppentrennung und Anreicherung

Wegen der geringen Konzentration von Pharmaka in Körperflüssigkeiten ist bei deren Nachweis zu beachten, daß die Aufarbeitung möglichst verlustarm erfolgt. Außerdem muß versucht werden, die organischen Stoffe, die physiologischerweise in biologischem Material vorkommen, zu vermindern oder abzusondern, ohne den gewünschten Nachweis zu beeinflussen.

3.1.1.1 Trennung durch Extraktion

Bisher ist kein Verfahren beschrieben. Ursächlich ist wohl die fehlende Löslichkeit in unpolaren Flüssigkeiten, die nötig wäre, um Allopurinol aus wässrigen Lösungen zu extrahieren. Siehe auch Abschnitt 2.1.1.

3.1.1.2 Aufbereitung von Urin und Blut

Die Isolierung von Allopurinol aus wässrigen Lösungen (durch fraktionierte Säulentrennung, Abschnitt 3.1.1.3, und durch Dünnschichtchromatographie, Abschnitt 3.1.1.4) erfordert unterschiedliche Vorbereitungen der Proben.

Urin kann im allgemeinen unverändert bearbeitet werden. Geronnenes Blut muß zuerst zentrifugiert werden, um die korpuskulären Bestandteile zu entfernen. Das Serum wird als Überstand abgehoben. Die notwendige Deproteinisierung kann entweder durch Ultrafiltration oder durch Ausfällung mit Säuren geschehen.

- a) Ultrafiltration: Hierzu ist ein geeigneter Membranfilter erforderlich (z. B. Centriflo - Membranfilterkegel). Das Serum wird 25 Minuten bei 4200 g Fliehkraft zentrifugiert (Endele und Lettenbauer, 14). Das klare Filtrat kann direkt weiterverarbeitet werden.
- b) Fällung mit verdünnter Säure: Das Serum wird z. B. mit der zweifachen Menge 5 %iger Trichloressigsäure versetzt. Dadurch wird das Protein denaturiert und kann abzentrifugiert werden. Der klare Überstand wird abgehoben. Um die überschüssige Trichloressigsäure zu entfernen, wird mehrmals mit Diäthyläther extrahiert. Die wäßrige Phase wird weiterverarbeitet (Endele und Lettenbauer, 14). Ein anderes Verfahren verwendet 3 %ige Perchlorsäure. Nach Enteiweißung kann die überschüssige Perchlorsäure mit 5 - normaler Kaliumhydroxidlösung als Kaliumsalz ausgefällt werden (Elion et al., 11).
- c) Fällung mit konzentrierter Säure: Anstelle verdünnter Trichloressigsäure verwendeten Hande et al. (15) konzentrierte Trichloressigsäure. Die Mengenangabe war nicht veröffentlicht. Das Gemisch wurde zentrifugiert (15 min bei 3000 g). Der deproteinisierte Überstand konnte direkt weiterverarbeitet werden, da für das verwendete Verfahren eine angesäuerte Probe erforderlich war.

3.1.1.3 Fraktionierte Abtrennung mit Säulen

Fraktionierte Abtrennung kann entweder nach Molekülgröße oder nach Ladungsmuster der Substanzen durchgeführt werden. Durch Variierung verschiedener Ionenaustauscher und Korngrößen sowie verschiedener Löslichkeiten bzw. pH - Werte des Fließmittels können die gesuchten Substanzen zurückgehalten oder durchgespült werden.

Brown und Bye (6) verwendeten folgendes Verfahren: Serum und Urin wurden mit einem Carbonat - Puffer auf pH 11 gebracht und filtriert. Die erhaltene Probe wurde nun über eine Ionenaustauschsäule gegeben. Die stationäre Phase war Chelex - 100 Cu^{2+} - Harz. Mit der angegebenen Pufferlösung wurde dann nachgespült. Nach Durchfluß und Trocknung der Säule konnten die retinierten Substanzen Allopurinol und Oxypurinol mit einer Ammoniaklösung eluiert werden.

Elion et al. (11) benützten ein anderes System; Urin oder deproteinisiertes Serum wurden leicht alkalisiert. Die Trennsäule war mit Dowex 50 x 12 (200 - 400 mesh) (H^+) gefüllt. Die erhaltenen Lösungen konnten hier direkt eingegeben werden. Nach Spülung mit leicht alkalischer Pufferlösung und Trocknung der Säule können die zurückgehaltenen Stoffe Allopurinol und Hypoxanthin mit 1 - normaler Salzsäure eluiert werden.

Oxypurinol, Xanthin und Harnsäure werden auf Dowex 50 x 12 (H^+) nicht absorbiert. Der Durchfluß wurde deshalb durch eine weitere Säule gegeben, deren stationäre Phase Dowex 1 x 8 (200 - 400 mesh) (Formiat) war.

Hier werden nun die drei bisher noch freien Substanzen zurückgehalten und können nach Spülen und Trocknen mit 0,02 - normaler Formiatlösung eluiert werden. Die Verwendung von radioaktiv markiertem $6 - {}^{14}\text{C}$ - Allopurinol zeigte, daß bei diesem Verfahren praktisch das gesamte Allopurinol bzw. Oxypurinol, das sich in Blut und Urin befand, erfaßt wurde.

Hande et al. (15) verwendeten die Dowex 50 W H^+ - Säule (0,08 x 5,0 cm) als einzige Trennsäule. Das mit konzentrierter Trichloressigsäure stark angesäuerte, deproteinisierte Serum wurde durch die Säule gefiltert, der Durchfluß verworfen. Oxypurinol wurde nun mit 6 ml destilliertem Wasser ausgelöst, im zweiten Schritt konnte das verbliebene Allopurinol mit 6 ml 1 - molarer NaOH - Lösung gewonnen werden. Die beiden Substanzen wurden durch einen dünnschichtchromatographischen Nachweis identifiziert. Eine genauere Untersuchung ergab, daß sich im ersten Eluat 92 % des eingesetzten Oxypurinols und weniger als 1 % des Allopurinols, im zweiten 90 % des Allopurinols und 1 - 2 % des Oxypurinols befanden. Der ebenfalls verarbeitete Urin konnte direkt eingesetzt werden (verwendete Menge: 2 ml). Das weitere Verfahren ist wie oben beschrieben.

Die erhaltenen Eluate wurden anschließend mit 1 - molarer NaOH - bzw. mit 4 - molarer HCL - Lösung neutralisiert.

3.1.1.4 Trennung durch Dünnschichtchromatographie bzw. Papierchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (beschrieben in Abschnitt 3.1.2.1) und die Papierchromatographie (3.1.2.2) sind ebenfalls zur Trennung geeignet. Die erhaltene Allopurinolbande kann z. B. mit Wasser (Elion et al., 11) oder mit einem Glycin - Natriumhydroxid - Puffer, pH 10,4 (Elion et al., 13) abgelöst und einer quantitativen Bestimmung zugeführt werden.

3.1.2 Verfahren zum Nachweis und zur Identifikation

3.1.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie ist zur Identifikation von Allopurinol gut geeignet. Zugleich kann die zu untersuchende Probe in weitere Fraktionen aufgeschlüsselt werden. Nach der Beschreibung in der British Pharmacopoeia (29) ist als Trägerschicht geeignetes Zellulosepulver erforderlich, das eine Substanz enthält, die bei UV - Licht von 254 nm Wellenlänge fluoresziert. Als mobile Phase wird die Verwendung von n - Butanol, der mit wäßriger Ammoniaklösung gesättigt ist, empfohlen.

Die zu bestimmende Substanz kann mit einer Eichlösung verglichen werden, die parallel dazu aufgetragen wird. Die Proben werden mit wäßriger Ammoniaklösung verdünnt. Nach der Laufzeit wird die Platte an der Luft getrocknet. Allopurinol absorbiert UV - Licht (254 nm) und ist deshalb über solchem als dunkler Fleck zu erkennen.

Messerschmid und Seitz (24) verwendeten als Trägerschicht Kieselgel F 254 als Fertigplatte. Es wurde jeweils 10 µg reines Allopurinol aufgetragen, das von verschiedenen Firmen in Tablettenform zur Verfügung stand. Als Laufmittel diente eine Lösung aus n - Butanol, Eisessig und Wasser im Verhältnis von 4 : 1 : 1. Auch hier wurden die Banden unter UV - Licht von 254 nm Wellenlänge identifiziert.

3.1.2.2 Papierchromatographie

Salim und Murphy (33) verwendeten bei ihrer Arbeit als Trägerflüssigkeit eine Lösung aus iso - Propanol und einer wäßrigen Ammoniumsulfatlösung im Verhältnis von 95 : 5. Auch hier erfolgte die Identifikation im UV - Licht, das von Allopurinol absorbiert wird.

In einer weiteren Arbeit von Elion et al. (11) wurde als mobile Phase mit Wasser gesättigter n - Butanol unter Ammoniakatmosphäre verwendet. Die eingesetzten Proben waren Allopurinol - und Oxypurinollösungen, die durch fraktionierte Säulentrennung aus Serum und Urin gewonnen wurden. (siehe Abschnitt 3.1.1.3).

3.1.2.3 Qualitative Spektrophotometrie

Zur Identifikation von Allopurinol sind auch Lichtabsorptionsspektren geeignet. Zur Verfügung stehen Ultraviolett - und Infrarotabsorptionsspektren.

- a) UV - Absorptionsspektrum: Es ist von Messerschmid et al. (24) und von Salim und Murphy (33) beschrieben. Sie verwendeten nur reine Allopurinollösungen. Die Kurve hat bei 250 nm und bei 220 nm Maxima, bei 231 nm ein Minimum.
- b) IR - Absorptionsspektrum: In der Arbeit von Chalmers et al. (7) sind die Infrarotspektren von Allopurinol und Oxypurinol abgebildet. Eine weitere Kurve zeigt eine Probe, die durch fraktionierte Säulentrennung (Abschnitt 3.1.1.3) aus Blut nach vorheriger Verabreichung von Allopurinol erhalten wurde. Das erhaltene Infrarotspektrum entspricht etwa dem des Allopurinolmetaboliten Oxypurinol.

3.1.2.4 Quantitative Spektrophotometrie

Durch Bestimmung der Extinktion ist eine quantitative Messung der Konzentration einer löslichen Substanz möglich. Der gelöste Stoff wird in eine standardisierte Küvette gegeben. Der Lichtstrahl einer charakteristischen Wellenlänge wird maximal absorbiert. Mit den Extinktionswerten zweier bekannter Vergleichslösungen und dem Extinktionswert der unbekannten Lösung kann deren Konzentration berechnet werden. Die Wellenlänge ist stoffspezifisch.

Für die Allopurinolbestimmung kommt eine Wellenlänge von 250 nm in Frage, da hier das Absorptionsmaximum besteht. Die Methode wurde von Elion et al. (11) verwendet. Die reinen Allopurinollösungen erhielten sie, indem sie die Allopurinolbande aus einem Papierchromatogramm herauslösten. Für Oxypurinol wurde entsprechend verfahren (siehe 3.1.1.4). Der pH - Wert der zu messenden Lösung wurde für Allopurinol auf 1, für Oxypurinol auf 10 eingestellt. Hier wurden die besten Ergebnisse erzielt.

3.1.2.5 Massenspektrometrie

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie wurden von Chalmers et al. (7) veröffentlicht. Sie verwendeten in ihrer Arbeit Proben, die durch fraktionierte Säulentrennung aufbereitet waren. Als Vergleich dienen reine Lösungen der einzelnen Substanzen. Alle Proben wurden durch Erstellung von UV - Absorptionsspektren voruntersucht.

Nach Abdampfung der Lösungsmittel konnten die trockenen Rückstände als Festproben zur Massenspektrometrie eingegeben werden. Verwendet wurde ein doppelfokussierendes Varian MAT Modell SM 1 Massenspektrometer. Die Eingabetemperatur betrug 220°C , die Ionisationsspannung 70 V, der Ionisationsstrom 300 μA , die Arbeitstemperatur 150°C . Für den Molpeak wurden bei

Allopurinol $136,037 \pm 0,002$ Ionenmassen, bei
Oxypurinol $152,034 \pm 0,001$ Ionenmassen

erhalten. Diese Werte liegen im gleichen Bereich wie bei den Isomeren Hypoxanthin ($136,039 \pm 0,001$) und Xanthin ($152,034 \pm 0,001$).

Es konnten noch mehrere Bestandteile aus den Proben isoliert werden, welche die Verfasser als Fragmente von Allopurinol und Oxypurinol betrachteten.

3.1.2.6 Polarographische Meßmethode

In der Veröffentlichung von Dryhorst et al. (9) wird mit der Polarographie eine direkte elektrochemische Methode zur Bestimmung von Allopurinol beschrieben. Das Medikament wird in wäßriger Lösung an einer pyrolytischen Graphitelektrode oxydiert. Dann wird es an einer tropfenden Quecksilberelektrode wieder reduziert, wobei die Reduktion polarographisch meßbar ist. Es ist auch eine Messung der Harnsäure in der gleichen Lösung möglich. Das Ergebnis ist zufriedenstellend, wenn der pH - Wert der wäßrigen Lösung im Bereich zwischen 0 und 6 liegt. Die Konzentration für Allopurinol soll zwischen 0,1 und 1 mMol/l betragen.

3.1.2.7 Hochdruckflüssigchromatographie

Die hochdruckflüssigchromatographische Bestimmung ist für Allopurinol sehr gut geeignet. Es liegen mehrere Arbeiten vor, die verschiedene Systeme erproben und gute Ergebnisse erzielten.

Die erste Bestimmung wurde von Simkin (34) veröffentlicht. Er verwendete als stationäre Phase das Polyacrylamid Bio Gel P - 2 (100 - 200 mesh), die mobile Phase war eine wäßrige Lösung mit einer 2 - molaren NaCl - und einer 0,05 - molaren Phosphatkonzentration. Allopurinol und Oxypurinol wurden in 0,05 - molarem Natriumphosphatpuffer (pH 7) zugegeben. Die Bestimmung wurde nur in reinen Lösungen vorgenommen.

Nelson et al. (28) beschrieben in ihrem Artikel die Bestimmung von Allopurinol und Oxypurinol sowie ihrer Nucleotide in Rattengewebe.

Zur Analyse wurde mit verdünnter Trichloressigsäure deproteinisiertes Plasma verwendet. Nach Zentrifugieren und Ausschütteln der Säure kann die Probe direkt verwendet werden.

Als Säulenfüllung diente das Anionenaustauscherharz PA 38, die mobile Phase war eine 0,015 - molare Kaliumphosphatlösung (pH 5,7). Die Arbeitstemperatur ist mit 40° C, die Fließgeschwindigkeit mit 15 ml/h beschrieben.

Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Radioaktivitätsmessung, da mit ^{14}C markiertes Allopurinol verwendet wurde.

In einer anderen Veröffentlichung zeigten Rodnan et al. (31) ein weiteres Verfahren mit dem gleichen Anionenaustauscher. Als Probe wurde enteweißtes Serum zugegeben, das von Probanden nach oraler Applikation von Allopurinol gewonnen wurde und mit einer bekannten Menge mit ^{14}C markiertem Oxypurinol versetzt war. Die Elution erfolgte mit einer linear steigenden Konzentration einer Ammoniumformiat - Lösung.

Die Wiederfindungsrate konnte durch die Radioaktivitätsmessung bestimmt werden, die absolute Oxypurinolmenge aus dem Kurvenverlauf des Chromatogramms.

Endele und Lettenbauer (14) beschrieben ein Verfahren, das apparativ weniger aufwendig ist als die oben angeführten. Das Ultrafiltrat oder der klare Überstand eines deproteinisierten Serums wurde mit einem inneren Standard versetzt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und direkt für die Analyse verwendet. Die stationäre Phase war der sphärische

Anionenaustauscher Aminex A - 28 Bio Rad, als mobile Phase diente eine 0,33 molare Ammoniumacetatlösung, die mit konzentrierter Essigsäure auf einen pH - Wert von 6,45 eingestellt war. Auf die exakte Einhaltung des pH - Wertes ist besonders zu achten, da bereits geringe Abweichungen die Trennung stark beeinflussen.

Brown und Bye (6) verwendeten als Säulenfüllung Aminex A - 27, welche durch die mobile Phase, einer 1 - molaren Ammoniumacetatlösung (pH 8,7) in die Acetatform übergeführt wird. Die getrennten Fraktionen wurden mit einem Lichtabsorptionsdetektor (Wellenlänge 254 nm) aufgezeichnet. Die Proben, die durch eine Chelex - 100 Cu^{2+} Säule vorbereitet waren (siehe 3.1.1.3), konnten direkt eingespritzt werden. Das Ergebnis für Allopurinol war sehr gut, das für Oxypurinol weniger.

Kramer und Feldmann (19) führten einen in vitro - Versuch durch. Allopurinol und Oxypurinol wurden Blut zugesetzt. Nach Zentrifugation, Enteiweißung und erneuter Zentrifugation wurde eine kleine Probe direkt in den Chromatographen eingespritzt. Als stationäre Phase verwendeten sie eine Umkehrphasensäule μ - Bondapak - C₁₈, die mit Wasser assoziiert war. Mit Kaliumphosphatpuffer (pH 6) konnte die Probe eluiert werden. Die Durchflußrate betrug 2 ml/min. Das Ergebnis wurde von einem UV - Absorptionsdetektor in einem Chromatogramm aufgezeichnet.

3.1.2.8 Gaschromatographische Bestimmung

Nur Miller, Pacakova und Smolkova (26) beschrieben eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von Allopurinol. Der Weg führte über eine frühere Arbeit der gleichen Autoren (25), in welcher sie bereits verschiedene Pyrimidinbasen nach Silylierung gaschromatographisch trennen konnten.

Silylderivate werden für die gaschromatographische Analyse nichtflüchtiger Substanzen verwendet. Fast alle polaren (- X - H) - Gruppen können durch die Silyläther blockiert werden. Die Derivatisierung kann in einer Eintopfreaktion erfolgen. Nach Übertragen der Trimethylsilylgruppe entsteht ein neutrales Amid, dessen Siedepunkt stark herabgesetzt und dessen Löslichkeit in unpolaren Flüssigkeiten verbessert ist (Vycudilik, 37).

1 ml der zuvor hergestellten Standardlösung (50 µg/ml Allopurinol in wässriger Ammoniaklösung) wurde unter Argon bei 90° C bis zur Trockne abgedampft. Der Rückstand wurde mit 250 µl BSTFA und 200 µl Pyridin 20 min bei 150° C erhitzt, wobei der Behälter ständig bewegt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend direkt analysiert.

Die Analyse wurde bei 150° C Arbeitstemperatur durchgeführt. Als stationäre Phasen wurden 3 % OV 101 und 3 % OV 17 auf Chromosorb W HP AW DMCS (100 - 200 mesh) gewählt. Innerer Standard war Phenanthren. Die Bestimmung erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor. Die Bestimmung wurde nur in reinen Allopurinollösungen vorgenommen.

3.1.2.9 Indirekter, enzymatischer Nachweis durch Hemmung der Xanthinoxidase

Das Verfahren basiert auf der Messung der verminderten Aktivität der reduzierten Xanthinoxidase, die durch Allopurinol und Oxypurinol hemmbar ist.

In der Veröffentlichung von Hande et al. (15) wurde Buttermilch - Xanthinoxidase (1,68 U/mg Protein) verwendet. Im ersten Schritt wurde das Enzym reduziert. 0,25 U Xanthinoxidase und 2 mg Dithionit je ml Pufferlösung (0,05 - molarer Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 und 0,01 - molare Äthylen - di - Amin - tetra - Acetat (EDTA) wurden unter Stickstoff eine Stunde bei 4° C inkubiert.

Im zweiten Schritt wurden 60 µl der reduzierten Xanthinoxidase - Puffer - Mischung mit dem Xanthinoxidasehemmer (Allopurinol oder Oxypurinol) 20 min in 540 µl der oben beschriebenen Pufferlösung mit 2 mg/ml Dithionit bei 37° C inkubiert.

Im dritten Abschnitt wurden 0,1 ml der Mischung mit Enzym und Hemmstoff in eine Küvette gegeben, welche bereits 2×10^{-5} Mol Xanthin, im oben beschriebenen Puffer gelöst, enthielt. Die Geschwindigkeit der Harnsäureproduktion wurde durch die Aufzeichnung der zunehmenden Lichtabsorption eines Lichtstrahls von 295 nm Wellenlänge in einem Spektrophotometer gemessen. Der Grad der Hemmung der Harnsäurebildung ist der Konzentration des Hemmstoffes direkt proportional. Die Hemmung konnte bis zu einer minimalen Konzentration von 10^{-8} Mol/l Allopurinol oder Oxypurinol gemessen werden.

Wenn die Xanthinoxidase nicht in reduziertem, sondern in oxidiertem Zustand vorliegt, sind 70 mal höhere Allopurinol - bzw. 600 mal höhere Oxypurinolkonzentrationen zur Enzymhemmung nötig. Es ist deshalb von entscheidender Bedeutung, daß das gesamte Enzym in der reduzierten Phase vorliegt.

Blut- und Urinproben sind vor der Bestimmung mit fraktionierter Säulentrennung aufgearbeitet worden, um Allopurinol und Oxypurinol im nötigen Reinheitsgrad vorliegen zu haben.

3.2 Benzbromaron

3.2.1 Verfahren zur Gruppentrennung und Anreicherung

Mit den hier angegebenen Verfahren können neben Benzbromaron auch seine Metaboliten Brombenzaron und Benzaron erfaßt werden.

3.2.1.1 Extraktionsverfahren

Die gute Löslichkeit von Benzbromaron in unpolaren Flüssigkeiten (siehe Abschnitt 2.2.1) ermöglicht eine einfache und gute Extrahierbarkeit. Die unpolare Phase muß von der wäßrigen vollständig trennbar sein.

Broekhuysen et al. (5) verwendeten zur Extraktion aus Faeces, Urin und Galle Äthyläther. Dies erfolgte bei neutralem pH - Wert und zum Teil nach vorausgegangener Hydrolyse etwaiger Glucuronverbindungen. Zur Extraktion aus Blut diente den gleichen Autoren heißes Methanol in Anwesenheit von Kieselgel H.

Yu (38) wählte als Extraktionsmittel Cyklohexan. Serum und Urin wurden vor der Verarbeitung angesäuert.

3.2.1.2 Dünnschichtchromatographisches Trennverfahren

Die Dünnschichtchromatographie ist in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben. Broekhuysen et al. (5) lösten die hier erhaltene Benzbromaronbande mit heißem Chloroform vom Trägermaterial wieder ab. Die anschließende quantitative Bestimmung erfolgte durch Radioaktivitätsmessung der mit Tritium markierten Substanz.

3.2.1.3 Hydrolyse

Da Benzbromaron und einige seiner Metaboliten in der Leber teilweise glukuronidiert werden, ist zur Bestimmung besonders aus dem Urin eine vorhergehende Hydrolyse nötig. Bei Broekhuysen et al. (5) sind drei Verfahren beschrieben:

- a) enzymatische Hydrolyse, eine selektive Hydrolyse von Glukuronverbindungen: 4 ml Urin werden mit 8 ml eines Acetatpuffers (0,2 - molar, pH 6,2) gemischt, der 260 U/ml einer Lösung aus Arylsulfatase und β - Glukuronidase enthält (Boehringer 15 427 EGAF). Die Probe wird 48 Stunden bei 37° C inkubiert, anschließend mit NaOH neutralisiert und mit Äthyläther extrahiert.
- b) saure Hydrolyse: Die Probe wird mit 0,1 - normaler Salzsäure versetzt und 48 Stunden bei 100° C inkubiert.
- c) alkalische Hydrolyse: Die Durchführung erfolgt wie unter b). Anstelle der Salzsäure wird 0,1 - normale Natronlauge verwendet.

3.2.2 Nachweis- und Identifikationsmethoden

3.2.2.1 Dünnschichtchromatographie

Mit der Dünnschichtchromatographie kann Benzbromaron anhand von Vergleichslösungen gut identifiziert werden. Ebenso läßt sich mit dieser Methode eine Probe in ihre einzelnen Fraktionen auftrennen und die Reinheit einer Lösung überprüfen.

Im Deutschen Arzneimittelcodex (2) ist die Dünnschichtchromatographie für Benzbromaron nach den Richtlinien des Europäischen Arzneibuches (1) angegeben. Sorptionsmittel ist Kieselgel GF₂₅₄ (R - Ph Eur), das in einer Schichtdicke von 0,25 mm auf einer Glasplatte aufgetragen ist. Aus der zu untersuchenden Probe wird eine 0,2 %ige (g/vol) Chloroformlösung (R - Ph Eur) hergestellt. Die Vergleichslösung ist eine 0,2 %ige (g/vol) Benzbromaronlösung in Chloroform. Aufgetragen werden getrennt voneinander jeweils 5 µl beider Lösungen. Als mobile Phase ist ein Gemisch aus Chloroform, Aceton und 98 %iger Essigsäure im Verhältnis 100 : 2 : 1 (vol/vol) vorgeschrieben. Die Laufstrecke beträgt 10 cm. Nach Trocknung in strömender Luft, bis der Lösungsmittelgeruch verschwunden ist, kann Benzbromaron unter UV - Licht (Wellenlänge 254 nm) als dunkler Fleck an der entsprechenden Stelle nachgewiesen werden.

Broekhuysen et al. (5) verwendeten bei ihrer Untersuchung präparative PF 254 Silicagel - Platten (Merck), 1 mm stark. Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Chloroform, Cyklohexan, Methanol und Essigsäure im Verhältnis 70 : 25 : 10 : 5 (vol/vol), beziehungsweise Chloroform, Aceton und Essigsäure im Verhältnis 100 : 2 : 1 (vol/vol). Die Versuche wurden bei

Raumtemperatur durchgeführt, die Banden durch Detektion bei UV - Licht (254 nm Wellenlänge) und durch Radioaktivitätsmessung identifiziert. (Das verwendete Benzbromaron war mit Tritium markiert.)

3.2.2.2 Qualitative Spektrophotometrie

Benzbromaron kann auch durch Lichtabsorptionsspektren identifiziert werden. Zur Wahl stehen Ultraviolett- und Infrarotabsorptionsspektrum. Sie sind beide im Deutschen Arzneimittelcodex (2) nach der Vorschrift des Europäischen Arzneibuches (1) beschrieben.

- a) UV - Absorptionsspektrum: verwendet wird eine 0,001 %ige (G/Vol) Benzbromaronlösung in 0,01 - normaler Natronlauge. Maxima finden sich bei 357 ± 2 nm und bei 242 ± 2 nm, das Minimum bei 287 nm.
- b) IR - Absorptionsspektrum: die Messung wird im Wellenlängenbereich von 2,5 - 15 μ m durchgeführt. Das Spektrum des Kaliumbromid - Präßlings muß alle wesentlichen Absorptionsbanden aufweisen, die für Benzbromaron charakteristisch sind.

3.2.2.3 Quantitative Spektrophotometrie

Eine quantitative Messung der Konzentration von Benzbromaron ist durch die Bestimmung der Extinktion bei monochromatischem Licht von 357 nm Wellenlänge möglich. Durch den Vergleich mit den Extinktionen bekannter Konzentrationen ist der gesuchte Wert zu berechnen. Die Methode ist nur bei reinen Lösungen durchführbar. (Deutscher Arzneimittelcodex, 2, und Europäisches Arzneibuch, 1)

3.2.2.4 Gaschromatographie

Die Veröffentlichung von Yu (38) beschreibt eine gaschromatographische Bestimmung von Benzbromaron. Der Extrakt aus Serum bzw. Urin wurde mit Essigsäureanhydrid derivatisiert und so der Analyse zugeführt. Als Geräte wurden verwendet: ein Hewlett - Packard Modell 5713 A Gaschromatograph, der mit einem ^{63}Ni Electron capture detector (ECD) und einem Schreiber Modell 3380 A ausgerüstet war.

3.3 Zusammenfassung der Literaturübersicht

3.3.1 Allopurinol

Verfahren zur Abtrennung:

Einfache Verfahren wie Extraktion durch Ausschütteln oder mit Extraktionssäulen sind nicht beschrieben. So bleibt die Dünnschichtchromatographie und die Verwendung von Ionenaustauscherharzen.

Bei ersterer (Abschnitt 3.1.1.4) kann Allopurinol nach erfolgter Identifikation mit einer alkalischen Lösung, z. B. einer wäßrigen Ammoniaklösung, vom Chromatogramm wieder abgelöst und einer quantitativen Bestimmung zugeführt werden.

Von den Ionenaustauscherharzen (Abschnitt 3.1.1.3) ist Dowex 50 x 12 (200 - 400 mesh) (H^+) für Allopurinol, Dowex 1 x 8 (200 - 400 mesh) (Formiat) für Oxypurinol und Chelex - 100 Cu^{2+} - Harz für beide geeignet.

Bei der Verarbeitung von Blut ist entweder das Ultrafiltrat oder deproteinisiertes Serum zu verwenden.

Urin kann direkt eingesetzt werden.

Die erzielten Ergebnisse sind zufriedenstellend, die Durchführungen bedingen allerdings einen beträchtlichen Aufwand an Zeit und Material.

Bestimmungsverfahren:

Neben zahlreichen unterschiedlichen Möglichkeiten für die qualitative und quantitative Bestimmung von Allopurinol ist nur ein gaschromatographisches Verfahren beschrieben (3.1.2.8). Hier ist die Bestimmung nur durchführbar, wenn Allopurinol als Pulver oder in reiner Lösung vorliegt und das Lösungsmittel abdampfbar

ist. Zur Blutspiegelbestimmung bzw. zur Bestimmung aus Urin sind also zusätzliche Abtrennverfahren (Dünnschichtchromatographie, Ionenaustauscherharze) nötig. Dies gilt ebenso für alle anderen beschriebenen Verfahren, mit zwei Ausnahmen:

- a) Dünnschichtchromatographie: Hier wird jedoch vorwiegend eine qualitative Bestimmung erfolgen.
- b) Hochdruckflüssigchromatographie nach Veröffentlichungen von Nelson et al. (28), Endeke und Lettenbauer (14) und Kramer und Feldmann (19). Die Methode kombiniert das hochdruckflüssigchromatographische Bestimmungsverfahren mit einem Trennverfahren durch Ionenaustauscherharze. Verwendet wurden folgende Harze: PA 38, Aminex A - 28 Bio Rad, u - Bondapak - C₁₈. Die quantitative Bestimmung geschah durch Messung der Radioaktivität bzw. der Lichtabsorption bei 254 nm.

3.3.2 Benzbromaron

Verfahren zur Abtrennung:

Die gute Löslichkeit von Benzbromaron auch in unpolaren Flüssigkeiten ermöglicht eine gute Extrahierbarkeit durch Ausschütteln (3.2.1.1). So kann Serum, Urin, Faeces und Galle gut verarbeitet werden. Bei Nachweis aus Urin und Galle ist eine der Abtrennung vorausgehende Hydrolysierung nötig, um das gesamte Medikament zu erfassen, da Benzbromaron in der Leber teilweise glukuronidiert und so auf renalem Weg ausgeschieden wird (3.2.1.2).

Bestimmungsverfahren:

Es sind nur wenig Verfahren beschrieben. Die Dünnschichtchromatographie dient nur der Identifikation oder qualitativen Bestimmung, zur qualitativen und quantitativen Spektrophotometrie ist eine reine Lösung erforderlich.

In einer neuen Veröffentlichung ist ein gaschromatographischer Nachweis beschrieben (3.2.2.4).

3.3.3 Aufgabenstellung

Das Ziel der folgenden Untersuchung ist die Aufstellung einer gaschromatographischen Analyse von Blut und Urin zur gezielten Bestimmung von Allopurinol und Benzbromaron, die beide therapeutisch in der Hyperuricämiebehandlung eingesetzt werden. Der Nachweis soll qualitativ und quantitativ erfolgen, die Methode einfach und ausreichend genau durchführbar sowie für den täglichen Laborbetrieb geeignet sein.

4. Eigene Versuche zum gaschromatographischen Nachweis der beiden Medikamente

4.1 Allopurinol

Die Untersuchungen sind erschwert durch die sehr hohe Schmelztemperatur von über 350°C und die schlechte Löslichkeit bzw. Unlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln (siehe Abschnitt 2.1.1).

4.1.1 Untersuchung underivatisierter Substanzen

4.1.1.1 Allopurinol

Folgende Lösungen wurden verwendet:

- a) Mit Allopurinol gesättigt, weniger als 20 mg/
100 ml Aceton
 - Äthylacetat
 - Äthylmethylketon
 - Chloroform
 - Toluol
 - Triäthylmethylketon

- b) 20 mg/100 ml Allopurinol in
 - Dimethylformamid (DMF)

Die gaschromatographische Untersuchung wurde im Gerät 5830 A der Firma Hewlett Packard durchgeführt. Als Detektor wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) gewählt, dessen Temperatur auf 300°C eingestellt wurde. Das Einspritzvolumen des automatischen Injektors betrug jeweils 3 μl . Das Gerät war mit einem Schreiber Modell 18850 A ausgerüstet.

Die einzelnen Versuche zum Nachweis sind in folgender Tabelle 4.1 zusammengestellt:

Tab. 4.1: Versuche zum Nachweis von underivatisiertem Allopurinol:

Stat. Phase	Arbeits-temp. °C	Zeit min	Injekt. temp. °C	Lösungsmittel
Sp 2250 DA	10° C/min ansteigend 170-290, dann 290 isotherm	14	250 und 300	Äthylacetat
Dexsil 400	10° C/min ansteigend 120-290, dann 290 isotherm	14	250 und 290	Aceton, Toluol Äthylmethylketon Triäthylmethylketon, Äthylacetat, Chloroform, DMF
Ultrabond	200 isotherm, dann 10° C/min ansteigend 200-290	10	250	alle wie oben
Sp 2250 DA	230 isotherm	10	250	alle wie oben
Dexsil 400	230 isotherm	10	250	Aceton, Äthylmethylketon, Triäthylmethylketon
Ultrabond	210 isotherm	10	250	Triäthylmethylketon, Aceton, Chloroform
Ultrabond	250 isotherm	20	250	Triäthylmethylketon, Aceton

Ergebnis: Auf keiner der untersuchten stationären Phasen konnte für Allopurinol in den beschriebenen Lösungen ein Peak erhalten werden.

4.1.1.2 Versuche mit gelösten Strukturanalogen von Allopurinol

Allantoin, Harnsäure, Hypoxanthin und Xanthin wurden jeweils in DMF und in Aceton gelöst, wobei alle Lösungen gesättigt waren.

Die Analysen wurden wie in 4.1.1.1 durchgeführt und sind in nachstehender Tabelle 4.2 angegeben. Die Injektionstemperatur betrug einheitlich 250° C.

Tab. 4.2: Versuche zum Nachweis von gelösten Strukturanalogen zu Allopurinol:

Stat. Phase	Arbeits-temp. °C	Zeit min	Lösungen
Sp 2250 DA	230 isotherm	10	Allantoin, Harnsäure, Hypoxanthin, Xanthin alle in DMF
Utrabond	200 isotherm, dann 10°C/min ansteigend 200-290	10	Allantoin, Harnsäure, Hypoxanthin, Xanthin alle in DMF
Ultrabond	250 isotherm	20	Allantoin, Harnsäure, Hypoxanthin, Xanthin alle in DMF und Aceton

Ergebnis: Auch die Strukturanalogen des Allopurinols, Allantoin, Harnsäure, Hypoxanthin und Xanthin ergaben keinen Peak auf den untersuchten stationären Phasen.

4.1.2 Derivatisiertes Allopurinol

Das Ziel der Derivatisierung ist, Allopurinol in eine Verbindung überzuführen, die in organischen Lösungsmitteln leichter löslich und deren Siedepunkt herabgesetzt ist. Als Angriffspunkt für eine Substitution ist die OH - Gruppe an C₄ geeignet.

4.1.2.1 Propionylierung in alkalischem Milieu

Die Acylierung erfolgte nach der Methode von Kauert (18). Allopurinol (100 µg) wird in mit Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) gesättigtem Wasser gelöst (5 ml). Nun werden 5 ml Äthylacetat und 200 µl Propionsäureanhydrid (PSA) hinzugegeben. Das Gemisch wird maschinell 1 Minute ausgeschüttelt und dann zentrifugiert, bis sich Wasser und Äthylacetat getrennt haben. Das substituierte Allopurinol soll sich nun im Überstand befinden, der abgehoben und nach Konzentrieren durch Abdampfen analysiert wurde.

Die gaschromatographische Untersuchung wurde wie in 4.1.1.1 durchgeführt, die Daten sind in folgender Tabelle 4.3 angegeben.

Tab. 4.3: Analyse nach Propionylierung in NaHCO₃ - Lösung:

Stat. Phase	Arbeitstemp. °C	Zeit	Injekt. °C
Sp 2250 DA	um 10° C/min ansteigend, von 170-290, anschließend 290 isotherm	13	verschieden 200 - 300

Eine weitere Derivatisierung wurde in mit Natriumbikarbonat (Na_2CO_3) gesättigtem Wasser versucht. Die Ausführung war wie zuvor beschrieben.

Gaschromatographische Analyse nach 4.1.1.1. Als Detektortemperatur des FID wurde 320°C gewählt. Die Daten siehe Tab. 4.4.

Tab. 4.4: Analyse nach Propionylierung in Na_2CO_3 - Lösung

Stat. Phase	Arbeitstemp. $^\circ\text{C}$	Zeit min	Injekt.temp. $^\circ\text{C}$
OV 1	300 isotherm	10	320
OV 1	320 isotherm	22	320

4.1.2.2 Propionylierung in Pyridin

Das Verfahren ist ebenfalls von Kauert (18) beschrieben. 50 μg in DMF (siehe 4.1.1.1) gelösten Allopurinols wurden in ein Reagenzglas pipettiert und zur Trockne eingeeengt. Nach Zugabe von 50 μl PSA und 50 μl Pyridin wurde das Gefäß mit einem Teflonschraubverschluß luftdicht abgeschlossen. Bei den einzelnen Versuchen wurde das Gemisch bei verschiedenen Temperaturen zwischen 60 (Wasserbad) und 150°C (Ölbad oder Aluminiumblock) jeweils 20 Minuten erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter dem Abzug abgedampft und in Äthylacetat bzw. n - Propanol aufgenommen.

Gaschromatographische Untersuchung nach 4.1.1.1. Auf Grund der geringen Menge des Analysenmaterials wurde die Probe von Hand eingespritzt, das Injektionsvolumen betrug 3 μl . Die Daten siehe Tab. 4.5.

Tab. 4.5: Analyse nach Propionylierung in Pyridin

Stat. Phase	Arbeits- temp. °C	Zeit min	Injekt. temp. °C	Lösungsmittel
Sp 2250 DA	10° C/min ansteigend 120-290, dann 290 isotherm	3	250	Äthylacetat
Sp 2250 DA	250 isotherm	10	250	Äthylacetat
Sp 2250 DA	250 isotherm	25	250	n - Propanol

4.1.2.3 Propionylierung in Triäthylamin

Die Derivatisierung und die Analysen wurden wie in 4.1.2.2 durchgeführt. Statt Pyridin wurde Triäthylamin verwendet.

Ergebnis der Propionylierungsversuche: Weder die Acylierung in alkalischer Flüssigkeit noch die in Pyridin und Triäthylamin war erfolgreich. In keiner Lösung und bei keiner stationären Phase konnte für Allopurinol ein Peak erzielt werden.

4.1.2.4 Chlorieren mit Thionylchlorid

Bei dieser Substitution soll die OH - Gruppe am C₄ durch ein Cl - Atom ersetzt werden.

50 µg Allopurinol wurden in eine verdünnte Thionylchloridlösung (SOCl₂) (10 µl in 100 µl Äthylacetat) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde luftdicht verschlossen und 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

In einem weiteren Versuch wurde 50 µg Allopurinol direkt in unverdünntes SOCl_2 (50 µl) gegeben. Auch hier wurde das Gefäß 24 Stunden bei Raumtemperatur luftdicht verschlossen.

Zur Durchführung des gaschromatographischen Nachweises siehe 4.1.1.1. Die Reaktionsgemische wurden direkt per Hand eingespritzt, jeweils 2 µl. Die Versuchsdaten sind in Tab. 4.6 aufgeführt.

Tab. 4.6: Nachweisversuch nach Chlorierung

Stat. Phase	Säulen- temperatur °C	Zeit min	Injekt. temp. °C	Probe
Sp 2250 DA	10° C/min ansteigend 170-290, dann 290 isotherm	13	300	verdünnte und unverdünnte SOCl_2 -Allopu- rinollösung

4.1.2.5 Derivatisierung mit Pentafluorpropionsäure

Etwa 50 µg Allopurinol wurden mit 100 µl Äthylacetat und 20 µl Pentafluorpropionsäure (PFPA) in einem Reagenzglas mit einem Teflonschraubverschluß luftdicht verschlossen und 30 Minuten im Wasserbad bei 60° C erwärmt. Dann wird das Gemisch abgedampft. Es bleibt ein öliges Rückstand, der nach Lösen in Äthylacetat bzw. in DMF weißflockig ausfällt.

Analysenversuch wie in 4.1.1.1. Jeweils 2 µl der gelösten Proben werden manuell eingespritzt. Die weiteren Angaben sind in Tab. 4.7 zusammengefaßt.

Tab. 4.7: Analyse der Probe nach Derivatisierung mit Pentafluorpropionsäure.

Stat. Phase	Arbeitstemp. °C	Zeit min	Injekt. temp. °C	Proben
Sp 2250 DA	10° C/min ansteigend 170-290, dann 290 isotherm	13	300	Rückstand in Äthylacetat und DMF gelöst

Ergebnis: Auch bei den weiteren Derivatisierungsversuchen mit Thionylchlorid und Pentafluorpropionsäure konnte kein Peak erhalten werden. Die durchgeführten Versuche brachten auch keine verbesserte Löslichkeit in unpolaren Flüssigkeiten.

4.1.3 Silylierung von Allopurinol

Der Versuch wurde nach den Angaben von Miller et al. (26) ausgeführt. Siehe auch Abschnitt 3.1.2.8.

Als Reagenz dient Bistrimethylsilyltrifluoracetamid (BSTFA).

0,5 µg Allopurinol werden mit 250 µl BSTFA und 200 µl Pyridin in einem Reagenzglas mit einem Teflonschraubverschluß luftdicht verschlossen und 20 Minuten bei 150° C in einem Ölbad oder Aluminiumblock erhitzt. Die erhaltene Lösung wird direkt analysiert.

Die gaschromatographische Untersuchung wurde auf einem Gerät Pye 104 Chromatograph der Firma Pye Unicam durchgeführt. Die Probe wurde manuell eingespritzt, das Injektionsvolumen betrug 2 µl. Als Detektor wurde ein Flammenionisationsdetektor gewählt, seine Temperatur war 240° C. Weitere Daten in folgender Tab. 4.8.

Tab. 4.8: Analyse nach Silylierung:

Stat. Phase	Arbeitstemp. °C	Zeit min	Injekt. temp. °C	Probe
3 % OV 17	150 isotherm	10	150	Allopurinol + BSTFA + Pyridin

Das Allopurinolderivat war gut chromatographierbar, wie in Abb. 4.1 dargestellt ist.

Nachteilig wirkte sich aus, daß sich das Siliziumdioxid rasch auf der Anode des FID abscheidet. Dies verändert die Empfindlichkeit und machte den Detektor nach der achten Probe unbrauchbar. Eine Löschung des FID vor der Injektion und Zündung nach Passieren des Lösungsmittels soll die Kontaminierung vermindern und damit die Funktionstüchtigkeit der Anlage verlängern (Axelson, Sjövall, 3).

Ergebnis: Im Chromatogramm des silylierten Allopurinols konnte dieses durch einen schmalen Peak erwartungsgemäß nachgewiesen werden. Die Retentionszeit betrug 5,45 min.

Abb. 4.1:

Chromatogramm des silylier-
ten Allopurinols. Stat.

Phase: 3 %ige OV 17 bei
150 °C, FID bei 240 °C



4.1.4 Versuche zur Isolierung von Allopurinol aus Urin

Da sich Allopurinol in organischen Flüssigkeiten mit Ausnahme von DMF sehr schlecht löst, andererseits sich Wasser in DMF löst und von diesem deshalb nicht vollständig abtrennen läßt, kommt eine Extraktion durch Ausschütteln in eine unpolare Phase nicht in Frage.

Eine weitere Methode ist die Absorption an XAD 2 - Säulchen (Brinkman Drug Screen). Der alkalisierte Urin (pH 9,5) wird aufgegeben und mit einer Pufferlösung gleichen pH - Wertes nachgespült. Nach Absaugen der wäßrigen Phase (Wasserstrahlpumpe) wurde mit DMF eluiert und dieses anschließend abgedampft. Bei der Weiterverarbeitung wie in 4.1.3 konnte im Chromatogramm kein Allopurinolpeak erzielt werden. Es waren zu viele anderweitige Substanzen mit abgetrennt worden. Außerdem war es auch nicht möglich, das Eluat in DMF gänzlich wasserfrei zu erhalten.

Ein weiterer Versuch, Allopurinol mit Dimethoxypropan (DMOP) von den Trennsäulchen abzulösen, brachte ebenfalls keinen Erfolg.

Bereits beschriebene Abtrennverfahren für Allopurinol mit Ionenaustauschersäulen konnten aus technischen Gründen nicht nachvollzogen werden. Sie sind in Kap. 3.1.1.3 angegeben.

4.2 Benzbromaron

Ein gaschromatographisches Bestimmungsverfahren für dieses Medikament ist bereits von Yu (38) beschrieben worden. Siehe auch Abschnitt 3.2.2.4.

Auf Grund der physikalischen und chemischen Eigenschaften, nämlich des relativ niedrigen Schmelzpunktes von etwa 150° C und der guten Löslichkeit in hydrophoben Flüssigkeiten, sollte der gaschromatographische Nachweis gut möglich sein.

4.2.1 Versuche mit nicht derivatisiertem Benzbromaron

Zunächst wurden folgende Standardlösungen hergestellt:

- a) 100 mg Benzbromaron in 100 ml Äthylacetat. Das Medikament war bereits in den ersten 30 ml vollständig gelöst.
- b) 10 mg Benzbromaron in 100 ml Äthylacetat; 10 ml der obigen Lösung wurden mit Äthylacetat auf 100 ml ergänzt.

Die gaschromatographische Untersuchung wurde wiederum in einem Gerät 5830 A der Firma Hewlett Packard durchgeführt. Als Detektor stand ein Flammenionisationsdetektor (FID) zur Verfügung, dessen Temperatur auf 300° C eingestellt wurde. Das Gerät war mit einem Schreiber 18850 A ausgerüstet. Jeweils 3 μ l der Lösung b) wurde automatisch eingespritzt. Weitere Daten in folgender Tab. 4.9. Das Chromatogramm ist in Abb. 4.2 dargestellt.

Tab. 4.9: Versuch zum Nachweis von nicht derivatisier-
tem Benzbromaron:

Stat. Phase	Arbeitstemp. °C	Zeit min	Injekt. temp. °C
Dexsil 400	10° C/min ansteigend 170-290, dann 290 isotherm	14	300

Ergebnis: Für den Benzbromaronpeak ergab sich eine Re-
tentionszeit von etwa 12 Minuten. Das starke Tailing
bedarf aber noch weiterer Verbesserung.

Zur Optimierung wurde die Chromatographierbarkeit auf
verschiedenen stationären Phasen untersucht. Die Durch-
führung erfolgte wie oben, Daten siehe Tab. 4.10. Das
Chromatogramm auf der stationären Phase Dexsil 400 ist
in Abb. 4.3 wiedergegeben.

Tab. 4.10: Weitere Versuche mit nicht derivatisiertem
Benzbromaron:

Stat. Phase	Arbeitstemp. °C	Injekt. temp. °C	Zeit min
Sp 2250 DA	250 isotherm	250	15
Dexsil 400	250 isotherm	250	12
Dexsil 400	270 isotherm	250	7
3 % OV 1	250 isotherm	250	15
2 % OV 101	250 isotherm	250	15

Abb. 4.2:

Chromatogramm von nicht derivatisiertem Benzbromaron.
Stationäre Phase: Dexsil 400,
FID bei 300 °C, weitere Temperaturen in betreffender
Tabelle.

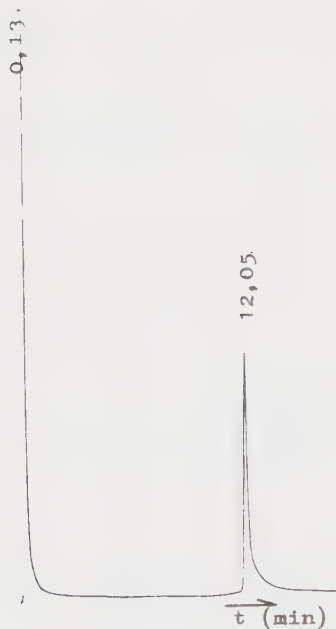


Abb. 4.3:

Chromatogramm von nicht derivatisiertem Benzbromaron.
Stationäre Phase: Dexsil 400
bei 270 °C isotherm, FID bei
300 °C.



Ergebnis: Auf den stationären Phasen 3 % OV 1 und 2 % OV 101 Chromosorb WHP konnte für Benzbromaron kein Peak erzielt werden. Rückblickend muß vermutet werden, daß die Arbeitstemperatur zu hoch angesetzt war und der Benzbromaronpeak vom Lösungsmittelpeak verdeckt wurde. Auf den anderen stationären Phasen konnten für den Benzbromaronpeak folgende Retentionszeiten erzielt werden: Sp 2250 DA: 12,9 min, Dexsil 400 bei 250° C: 10,4 min, bei 270° C: 5,1 min. Die Erhöhung der Arbeitstemperatur um 20° C bewirkte etwa eine Halbierung der Retentionszeit.

Der Benzbromaronpeak erschien für eine quantitative Auswertung wenig brauchbar, da ein starkes Tailing auftrat. Das Ergebnis mit der Säule Dexsil 400 war besser als das mit der Säule Sp 2250 DA. Eine weitere Verbesserung sollte nun mit einer Derivatisierung von Benzbromaron versucht werden.

4.2.2 Derivatisierung von Benzbromaron

Durch die Derivatisierung werden die polaren Gruppen des Medikaments mit unpolaren Kohlenwasserstoff - Gruppen besetzt. Hierdurch wird die Löslichkeit in hydrophoben Flüssigkeiten verbessert und die Retentionszeit beim gaschromatographischen Trennverfahren einheitlicher, d. h. die Basis des Peaks wird schmaler. Ort der Derivatisierung des Benzbromarons ist die 4 - Hydroxy - Gruppe des Benzoylringes.

4.2.2.1 Propionylierung in alkalischem Milieu

Das Verfahren nach Kauert (18) wird wie oben beschrieben (Abschnitt 4.1.2.1) durchgeführt. 50 µg Benzbromaron (in der Standardlösung), 5 ml Äthylacetat, 5 ml mit NaHCO₃ gesättigtes Wasser und 200 µl PSA werden in ein Reagenzglas gegeben und mit einem Glas- oder Teflonverschluß verschlossen. Ein Gummistopfen oder ein sonstiger

Plastikverschluß ist wegen des aggressiven PSA nicht geeignet. Das Gemisch wird anschließend 1 Minute auf einem maschinellen Rüttler ausgeschüttelt und dann zentrifugiert. Das überstehende Äthylacetat wird abgehoben und die wäßrige Phase verworfen.

Die gaschromatographische Untersuchung erfolgt wie in 4.2.1, wobei der oben gewonnene Überstand direkt eingesetzt werden kann. Folgende in Tab. 4.11 angegebenen Versuche wurden durchgeführt:

Tab. 4.11: Untersuchung von propionyliertem Benzbromaron

Stat. Phase	Arbeitstemp. °C	Injekt. temp. °C	Retent.zeit min
Dexsil 400	10° C/min ansteigend 170-290, dann 290 isotherm	300	12,9
Sp 2250 DA	250 isotherm	270	16,4
Dexsil 400	250 isotherm	270	14
Dexsil 400	270 isotherm	270	6,6
OV 101	250 isotherm	270	6,2
OV 101	270 isotherm	270	3,2
OV 1	250 isotherm	270	4,7
OV 1	270 isotherm	270	2,4

Abb. 4.4:

Chromatogramm von propionyliertem Benzbromaron.

Stationäre Phase: Dexsil

400 bei 270 °C isotherm,

FID bei 300 °C



Abb. 4.5:

Chromatogramm von propionyliertem Benzbromaron.

Stationäre Phase: OV 101

bei 250 °C isotherm, FID

bei 300 °C.

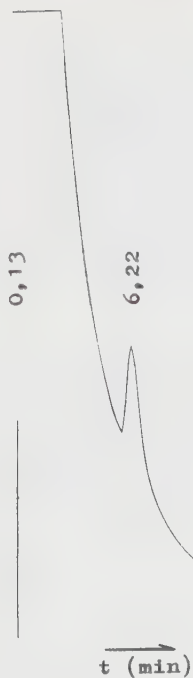


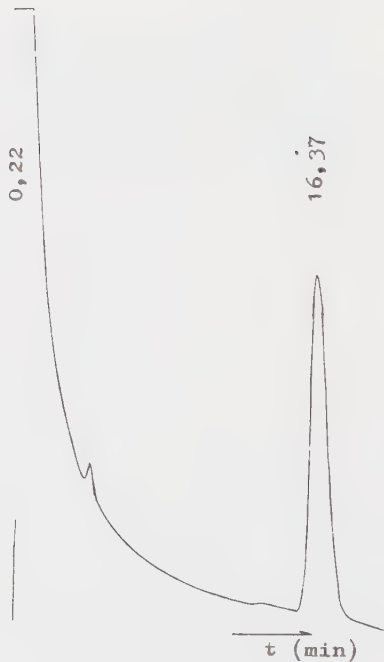
Abb. 4.6:

Chromatogramm von propionyliertem Benzbromaron. Stationäre Phase: Dexsil 400 bei um 10°C / min ansteigender Temperatur von $170 - 290^{\circ}\text{C}$, dann bei 290°C isotherm. FID bei 300°C



Abb. 4.7:

Chromatogramm von propionyliertem Benzbromaron. Stationäre Phase: Sp 2250 DA bei 250°C isotherm. FID bei 300°C



Ergebnis: Die erzielten Retentionszeiten für Benzbromaron sind in oben stehender Tab. 4.1.1 angegeben. Zu weiteren Untersuchungen wurde die Säule OV 1 bei 250° C gewählt, da hier bei niedriger Arbeitstemperatur und günstiger Retentionszeit ein sehr gutes chromatographisches Verhalten erzielt werden konnte. Die erhaltenen Chromatogramme siehe Abb. 4.4 bis 4.7 und 4.9.

Bei geringen Mengen von Benzbromaron wirkte ein Eigenpeak des Äthylacetats störend, der durch eine Verunreinigung bedingt ist und eine ähnliche Retentionszeit hat und deshalb den Benzbromaronpeak verdeckt. Durch Destillation des Lösungsmittels ließ sich die unerwünschte Substanz völlig eliminieren.

4.2.2.2 Propionylieren in Pyridin

Auch dieses Verfahren ist bereits oben beschrieben (Abschnitt 4.1.2.2). 50 µg Benzbromaron werden aus der Standardlösung in ein Reagenzglas pipettiert, das Lösungsmittel Äthylacetat wird abgedampft. Nach Zugabe von 50 µl PSA und 50 µl Pyridin wird das Glas mit einem Teflonschraubverschluß luftdicht verschlossen und in einem Aluminiumblock 20 Minuten bei 100° C erwärmt. Danach wird die Reaktionsflüssigkeit unter dem Abzug abgedampft und der trockene Rückstand in Äthylacetat aufgenommen.

Die gaschromatographische Untersuchung wurde wie in 4.2.2.1 durchgeführt. Die Resultate sind den obigen entsprechend. Bereits bei der extraktiven Propionylierung wurde eine vollständige Derivatisierung erreicht.

4.2.3 Einführung eines inneren Standards

Zur genauen Definition der Retentionszeit und zur quantitativen Auswertung der gaschromatographischen Trennung ist ein innerer Standard nötig, der den zu bestimmenden Proben zugegeben wird.

Hierfür wurde das Dicoumarolpräparat Phenprocoumon gewählt. Es ist ebenso wie Benzbromaron in alkalischer Lösung und in Äthylacetat gut löslich. Außerdem läßt es sich, wie die Versuche ergaben, gut mit PSA derivatisieren. Dies kann im gleichen Arbeitsgang mit Benzbromaron geschehen.

4.2.3.1 Untersuchung von nicht derivatisiertem Phenprocoumon

Zuerst wurden zwei Standardlösungen hergestellt:

- a) 100 mg Phenprocoumon in 100 ml Äthylacetat
- b) 10 mg Phenprocoumon in 100 ml Äthylacetat. 10 ml der Lösung a) wurde mit Äthylacetat auf 100 ml verdünnt.

Die gaschromatographische Untersuchung erfolgte analog der in Abschnitt 4.2.1. Zum Einsatz kam Lösung b), die weiteren Angaben sind in folgender Tab. 4.12 zu sehen.

Tab. 4.12: Versuch mit nicht derivatisiertem Phenprocoumon:

Stat. Phase	Arbeitstemp.	Injekt. temp.	Retent.zeit
3 % OV 1	250° C isotherm	270° C	1,53 min

Ergebnis: Für Phenprocoumon konnte ein Peak mit sehr schlechtem Tailing erzielt werden. Die Retentionszeit war 1,53 Minuten. Das Chromatogramm ist in Abb. 4.8 zu sehen. Auf Grund des ungünstigen Peaks ist bei Verwendung von Phenprocoumon eine Derivatisierung unumgänglich.

4.2.3.2 Untersuchung von propionyliertem Phenprocoumon

Die Derivatisierung kann in gesättigter wäßriger NaHCO_3 - Lösung oder in Pyridin erfolgen. Die Durchführung geschah analog der in 4.2.2.1 und 4.2.2.2.

Die gaschromatographische Analyse der Probe war der bei Benzbromaron entsprechend (Abschnitt 4.2.2.1). Siehe auch Tab. 4.13.

Tab. 4.13: Analyse der Lösung mit propionyliertem Phenprocoumon

Stat. Phase	Arbeitstemp.	Injekt.temp.	Retent.zeit
3 % OV 1	250° C isotherm	270° C	2,35 min

Ergebnis: Für propionyliertes Phenprocoumon konnte ein sehr gut brauchbarer Peak erzielt werden. Die Retentionszeit war bei 2,3 Minuten. Das Chromatogramm einer propionylierten Benzbromaron - Phenprocoumon - Lösung ist in Abb. 4.9 zu sehen.

Abb. 4.8:

Chromatogramm von underivatisiertem Phenprocoumon.

Stationäre Phase: 3 %ige OV 1 bei 250 °C isotherm.

FID bei 300 °C



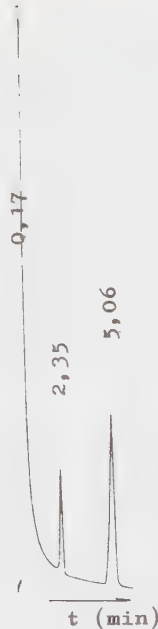
Abb. 4.9:

Chromatogramm einer propionylierten Benzbromaron - Phenprocoumon - Lösung.

Stationäre Phase: 3 %ige OV 1 bei 250 °C isotherm.

FID bei 300 °C.

Retentionszeit 2,35 min entspricht Phenprocoumon, 5,06 min entspricht Benzbromaron



4.2.3.3 Untersuchung der Retentionszeiten

Das Verhältnis der Retentionszeit von Benzbromaron zu der von Phenprocoumon ergibt einen Wert zwischen 2,11 und 2,15, bezogen auf die Zeit des Standards gleich 1. Dabei zeigt sich, daß niedrige und sehr niedrige Benzbromaronkonzentrationen zum unteren, höhere zum oberen Wert tendieren. Ursächlich dürfte wohl die breitere Basis der größeren Peaks bei zunehmender Konzentration sein.

4.2.3.4 Aufstellen einer Eichkurve

Die Eichkurve soll mit Hilfe des Standards eine quantitative Bestimmung von Benzbromaron aus wäßrigen Lösungen ermöglichen. Es soll eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Peakhöhenverhältnis Benzbromaron zu Phenprocoumon erstellt werden.

Als Verfahren wurde die Propionylierung in alkalischem Milieu gewählt (Kap. 4.2.2.1). In jeweils 5 ml wäßriger NaHCO_3 - Lösung (gesättigt, pH 8,5) wurde 20 µg Phenprocoumon und um 1 µg abgestuft von 1 bis 10 µg, um 2 µg abgestuft von 12 bis 30 µg und um 5 µg abgestuft von 35 bis 50 µg Benzbromaron pipettiert. Nach Zugabe von je 3 ml Äthylacetat und 200 µl PSA wurden die Reagenzgläser mit einem geschliffenen Glasstopfen verschlossen und eine Minute auf einem mechanischen Rüttler ausgeschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde nun zentrifugiert und der unpolare Überstand abgehoben und durch Abdampfen auf etwa 200 µl konzentriert. Die gaschromatographische Bestimmung erfolgte wie in 4.2.1 beschrieben.

Anhand der erzielten Ergebnisse wurden folgende Regressionsgeraden errechnet (Quotient der Peakhöhen von Benzbromaron zu Phenprocoumon):

- a) für alle Werte der zugeführten Benzbromaronmengen von 1 bis 50 μg :

$$y = - 2,53 + 0,017 x$$

bzw. $x = 1,81 + 56,38 y$

Der Korrelationskoeffizient betrug 0,989.

- b) für die zugeführten Benzbromaronmengen von 3 bis 10 μg :

$$y = - 2,43 + 0,0157 x$$

bzw. $x = 1,62 + 62,92 y$

Korrelationskoeffizient: 0,993

Auf der x - Koordinate sind die zugegebenen Benzbromaronkonzentrationen aufgetragen, auf der y - Koordinate die Quotienten der gemessenen Peakhöhen (Benzbromaron zu 20 μg Phenprocoumon).

Die Nachweisgrenze liegt bei dem beschriebenen Verfahren unter 1 μg Benzbromaron in der zu untersuchenden Probe. Die quantitative Bestimmung ist ab 2 μg möglich. Die Regressionsgerade schneidet deshalb das Koordinatenkreuz nicht, weil sich der Phenprocoumon- und der Benzbromaronpeak noch auf dem Tailing des PSA - Peaks befinden. Dies ist durch eine vollständige Abdampfung des PSA's vermeidbar.

Abb. 4.10:

Chromatogramm von propionyliertem Benzaron und Phenprocoumon.

Stationäre Phase: 3 %ige OV 1 bei 250 °C isotherm.
FID bei 300 °C.

Retentionszeit 2,16 min
entspricht Benzaron, 1,95
entspricht Phenprocoumon.



4.2.4 Benzaron

Die Derivatisierung und die gaschromatographische Untersuchung läßt sich analog zum Benzbromaron durchführen, dessen dehalogenierte Form und wichtigster Metabolit es ist.

Benzaron und Phenprocoumon wurden mit PSA in Pyridin propionyliert (siehe 4.2.2.2 und 4.2.3.2). Das Chromatogramm wurde ebenso nach den dort beschriebenen Angaben erstellt und ist in Abb. 4.10 zu sehen.

Ergebnis: Für Benzaron konnte eine sehr gute Peakform erzielt werden. Die Retentionszeit war 1,95 Minuten. Trotz des geringen Abstands zu Phenprocoumon (Retentionszeit 2,16 Minuten) werden beide Substanzen gut voneinander getrennt.

Das Verhältnis der Retentionszeit von Benzaron zu der des Standards Phenprocoumon beträgt zwischen 0,875 und 0,890.

4.2.5 Versuche zur Abtrennung aus Urin

4.2.5.1 Direkte Verarbeitung des Urins

Zum Nachweis von Benzbromaron aus Urin ist die Derivatisierung in alkalischer Lösung gut brauchbar. Die Probe kann direkt mit NaHCO_3 alkalisiert und nach der in 4.2.2.1 angegebenen Methode verarbeitet werden. Das Ergebnis entspricht dem bei wäßriger NaHCO_3 - Lösung.

Der Versuch mit Leerurin brachte keinen Hinweis auf Substanzen, welche die Analyse stören würden.

4.2.5.2 Abtrennung mit XAD 2 - Säulchen

Ein weiterer Trennversuch wurde mit XAD 2 - Säulchen unternommen. Sie sind mit organischem Absorptionsharz gefüllt. Der Urin, dem Benzbromaron zugegeben ist (10 und 100 $\mu\text{g/ml}$), wird zuvor alkalisiert (NaHCO_3 - Na_2CO_3 - Puffer, pH 9,5). Dann werden 15 ml durch das

Säulchen gegeben und die wäßrige Phase abgesaugt. Die Rückstände wurden hier mit Äthylacetat bzw. mit einem Gemisch aus Dichloräthan und Äthylacetat (40 : 60) eluiert. Nach Propionylierung ergab die anschließende Analyse kein entsprechendes Ergebnis. Die Wirksamkeit der Elution ist nicht untersucht worden.

4.2.5.3 Saure Hydrolyse etwaiger Glukuronverbindungen

Um auch die nach Broekhuysen et al. (5, siehe 2.2.2) zu erwartende glukuronidierte Benzbromaronfraktion zu erfassen, wurde die Beständigkeit von Benzbromaron, von seinem Hauptmetaboliten Benzaron und vom Standard Phenprocoumon untersucht.

Die Substanzen wurden in 20 ml entmineralisiertem Wasser gelöst. Nach Zugabe von 10 ml konzentrierter Salzsäure (37 %ig) wurden die Proben 30 Minuten mit einem Bunsenbrenner unter dem Abzug bei 100° C erhitzt. Nach folgender Propionylierung konnten sie noch alle gaschromatographisch nachgewiesen werden.

Bei geringer Zugabe der Medikamente in den Urin war die Wiederfindungsrate nach Hydrolysierung unterschiedlich. Dies könnte darauf beruhen, daß sich die Zusätze mit anderen Substanzen zu unlöslichen Komplexen verbinden und dadurch für die Analyse verloren gehen.

4.2.6 Versuche zur Abtrennung aus Blut

Blut, Plasma oder Serum können nicht direkt derivatisiert werden. In Verbindung mit NaHCO_3 , PSA und Äthylacetat verklumpt das Gemisch sofort.

Bei den nachstehend beschriebenen Experimenten wurde Blut mit Heparinzusatz, Leichenblut oder Rinderblut verwendet. Benzbromaron und Phenprocoumon wurden als

Äthylacetat- bzw. als Chloroformlösung (jeweils 10 mg in 100 ml) zugegeben und dann die Rückgewinnung versucht.

4.2.6.1 Extraktion durch Ausschütteln

Das Verfahren dient zur Gewinnung lipophiler Substanzen aus wäßrigen Lösungen, die hier in eine unpolare Phase übertreten und so abgetrennt werden können. Die Wirksamkeit kann durch geeignete Wahl des pH - Wertes deutlich gesteigert werden.

Wahl des Extraktionsmittels: Lösungsmittel lassen sich nach ihrer eluierenden Wirkung zur sogenannten "elutropen Reihe" nach Stahl (36) ordnen. Mit der Elutionswirkung nimmt die Polarität zu. Es wurden folgende Flüssigkeiten untersucht:

Äthylacetat
Diäthyläther
Chloroform
Benzol
Tetrachlorkohlenstoff
Cyklohexan

Wahl des pH - Wertes: Es wurde ein Wert von 6,5 gewählt, da Benzbromaron und Phenprocoumon in sauren Flüssigkeiten kaum löslich sind. Die Proben wurden hierzu mit einer isotonischen Pufferlösung versetzt, die aus 0,15 - molarer di - Natriumhydrogenphosphat - (Na_2HPO_4 , sekundäres Phosphat) und Kalium - di Hydrogen - Phosphat (KH_2PO_4 , primäres Phosphat) - Lösung hergestellt wurde.

- a) Äthylacetat ist für die Extraktion von Benzbromaron und Phenprocoumon gut geeignet. Nachteilig wirkt ein Eigenpeak im Gaschromatogramm, der etwa die gleiche Retentionszeit wie Benzbromaron

hat und eine vorherige Reinigung des Extraktionsmittels durch Destillation erfordert.

b) Diäthyläther extrahiert ebenfalls gut. Hier jedoch erscheint eine unbekannte Substanz mit einer Retentionszeit ähnlich der des Phenprocoumons.

c) Chloroform

d) Benzol

e) Tetrachlorkohlenstoff

Alle drei Lösungsmittel extrahieren gut. Störenden Substanzen sind nicht vorhanden.

f) Cyklohexan: Hier ist Phenprocoumon nicht so gut löslich.

4.2.6.2 Ausschütteln des Extraktes in verdünnte Natronlauge

Das Ausschütteln dient einer Säuberung des Extraktes. Es wurde eine 0,1 - normale Natronlauge (NaOH) verwendet.

a) Extraktion mit Äthylacetat: Der pH - Wert der Natronlauge ist zu basisch, so daß beim Ausschütteln eine Verseifung der Esterverbindung des Äthylacetats erfolgte. Die Methode ist daher hier nicht verwendbar.

b) Extraktion mit Chloroform: Dieses Extraktionsmittel verhält sich zur NaOH - Lösung völlig neutral.

Die Probe in 3 ml Chloroform gelöst, wurde mit ebenfalls 3 ml 0,1 - normaler Natronlauge ausge-

schüttelt und trat in die wäßrige Phase über, die nach Zentrifugieren abgehoben und noch zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt wurde. Dann wurde sie leicht angesäuert (z. B. mit HCL). Die Probe konnte nun mit Chloroform wieder extrahiert werden.

Die Substanzen mit kurzen Retentionszeiten im Gaschromatogramm bleiben fast alle in der Probe, während jene mit längeren Retentionszeiten, vor allem das Cholesterin eliminiert werden. Das Chromatogramm wird also kaum übersichtlicher, aber seine Durchlaufzeit verkürzt sich um etwa zwei Drittel der sonstigen Zeit.

In der Verdünnungsreihe in Blut (Kapitel 4.2.6.5) ergab sich ein flacherer Kurvenverlauf. Die Ursache wurde nicht untersucht. Vermutlich war der Rückgewinnungsgrad des Benzbromarons geringer als der des Phenprocoumons.

4.2.6.3 Extraktionsverfahren mit Extrelutsäulchen

Es wurden Fertigsäulchen der Firma E. Merck verwendet. Sie sind mit einem körnigen, porösen, unpolaren Kieselgur-Trägermaterial gefüllt, auf welches die zu untersuchende Probe verteilt wird. Mit einem unpolaren Lösungsmittel können dann die lipophilen Substanzen eluiert werden. Die Porösität des Füllstoffes bewirkt eine große Austauschfläche.

Bei der Untersuchung wurde 5 ml Leichenblut nach der Extraktionsvorschrift mit 15 ml isotonischer Pufferlösung (pH 6,5, siehe auch 4.2.6.1) verdünnt und mit jeweils 20 µg Benzbromaron und Phenprocoumon versetzt. Nachdem das Gemisch 20 Minuten in die Säule eingezogen

war, wurde mit 50 ml Chloroform eluiert. Nach Abdampfung des Lösungsmittels konnte die Probe mit Pyridin und PSA propionyliert und dann analysiert werden.

Gegenüber der direkten Extraktion wurde keine Verbesserung der Ausbeute gesehen.

4.2.6.4 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration des Blutes oder Serums dient der Enteiweißung. Dies ermöglicht, daß das Filtrat mit den gefilterten Substanzen direkt weiterverarbeitet werden kann.

Es wurde das Gerät Micro - Thin - Channel Ultrafiltration System TCF 2 A und der Filter PM 10 Diaflo Ultrafiltrationsmembran der Firma Amicon verwendet. 100 ml eingesetztes Rinderblut ergaben 27 ml klares Ultrafiltrat. Dieses wurde nach der in 4.2.2.2 beschriebenen Methode derivatisiert. Die Analyse ergab, daß nahe der Retentionszeit von Benzbromaron ein Peak einer unbekannten Substanz erschien.

Da die Methode sehr aufwendig ist, wurde sie nicht weiter untersucht. Insbesondere wurde auch nicht geprüft, in welcher Größenordnung Benzbromaron von der Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten wird.

4.2.6.5 Eichreihe für Benzbromaron in Blut

Als Extraktionsmittel wurde Chloroform gewählt (4.2.6.1). Die Standardlösung konnte erst dem Extrakt zugegeben werden, da Phenprocoumon offensichtlich der Proteinbindung wegen nicht mehr vollständig aus dem Blut extrahiert werden konnte. Dieses Problem wurde dadurch umgangen, daß das eingesetzte und das zurückerhaltene

Chloroform jeweils gewogen wurde und die prozentuale Rückgewinnung gleich der prozentualen Extraktion angenommen wurde. Die Extraktionsausbeute liegt nahe bei 100 %, da bei einer Zweitextraktion aus 4 ml Blut, dem vor der ersten Extraktion 20 µg Benzbromaron zugesetzt war, dieses nicht mehr nachweisbar war, d. h. die verbliebene Benzbromaronkonzentration war unter die Erfassungsgrenze gesunken.

Extraktionsverfahren: 4 ml Blut wurden jeweils mit der doppelten Menge (8 ml) isotonomischer Pufferlösung (pH 6,5, siehe 4.2.6.1) verdünnt. Dann wurde Benzbromaron in Chloroform gelöst (10 mg in 100 ml) in verschiedenen Mengen von 2 bis 20 µg zugegeben. Die Extraktion erfolgte mit 10 ml Chloroform bei fünfminütiger Ausschüttelung in einem verschlossenen Gefäß. Der prozentuale Anteil des zurückerhaltenen Lösungsmittels wurde aus der Wägung des eingesetzten und zurückgewonnenen Chloroforms errechnet. Anschließend konnten 20 µg Phenprocoumon als Standard zugegeben werden.

Die Propionylierung erfolgte wie in 4.2.2.2, die gaschromatographische Untersuchung wie in 4.2.1.

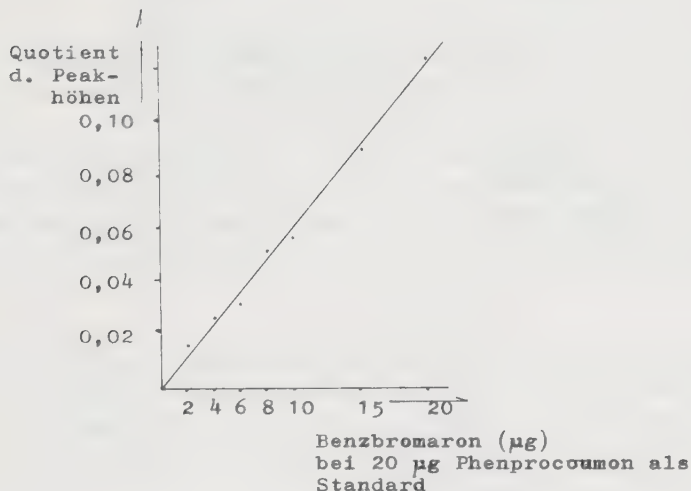
Zur Auswertung der Chromatogramme wurden die erhaltenen Werte in ein Koordinatensystem (Abb. 4.11) eingetragen. Die x - Koordinate enthält die zugesetzten Benzbromaronfraktionen, auf der y - Koordinate sind die Quotienten der gemessenen Peakhöhen (Benzbromaron zu 20 µg Phenprocoumon) aufgezeichnet. Der Standard war mit 20 µg Phenprocoumon in allen Proben konstant.

Die Werte ergeben folgende Regressionsgerade:

$$y = 0,00614 x$$

$$\text{bzw. } x = 162,8 y$$

Abb. 4.11: Regressionsgerade und Werte der Eichreihe.



Der Grenzwert einer quantitativen Bestimmung liegt bei 2 μg Benzbromaron in einer Probe von ca. 5 ml, also etwa bei 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blut. Der qualitative Nachweis ist ab etwa 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blut möglich.

Die gaschromatographische Analyse der Proben soll im Anschluß an die Derivatisierung erfolgen. Bei der vorliegenden Untersuchung wurden die Chromatogramme sofort nach der Propionylierung, einen und zwei Tage später erstellt. Dies ergab einen immer steileren Verlauf der Regressionsgerade und läßt auf eine geringere Beständigkeit des Phenprocoumon - Propionylats schließen.

4.2.7 Nachweis in Urin

Für die Untersuchung wurde Urin verwendet, der zwischen der 4. und der 6. Stunde nach einmaliger oraler Verabreichung von 100 mg Benzbromaron ausgeschieden wurde.

4.2.7.1 Nachweis von nicht glukuronidiertem Benz- bromaron

Extraktion und Derivatisierung wurden wie in 4.2.2.1 und in 4.2.4.4 beschrieben ausgeführt.

Bei der Verarbeitung von 20 ml Urin konnte weder Benz-
bromaron noch sein Hauptmetabolit Benzaron nachgewie-
sen werden. Dies bedeutet, daß weniger als 1 µg unkon-
jugiertes Benzbromaron in den 20 ml Urin vorhanden
waren.

In einer weiteren Untersuchung von 50 ml Urin konnten
bei den Retentionszeiten von Benzbromaron und von
Benzaron kleine Peaks erzielt werden. Die Menge des
unkonjugierten Benzbromarons war zu gering für eine
quantitative Auswertung.

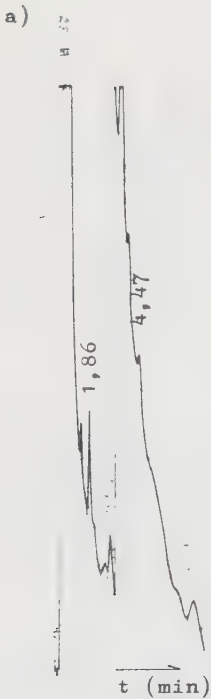
4.2.7.2 Nachweis von glukuronidiertem Benzbromaron

20 ml Urin wurden, wie in 4.2.5.3 beschrieben, hydroly-
siert. Die Extraktion und Derivatisierung erfolgte wie
in 4.2.2.1.

Bei der Retentionszeit von Benzbromaron konnte ein
kleiner, bei der von Benzaron ein größerer Peak er-
zielt werden. Das Chromatogramm ist in Abb. 4.12 wie-
dergegeben. Eine quantitative Bestimmung wurde nicht
durchgeführt.

Abb. 4.12 a und b: Chromatogramm eines hydrolysierten Urins, der 4 - 6 Stunden nach oraler Applikation von 100 mg Benzbromaron gewonnen wurde. Stationäre Phase: 3 %ige OV 1 bei 250° C, FID bei 300° C.

- | | | | | |
|----|------|---------|------------|--------------|
| a) | 4,47 | Minuten | entspricht | Benzbromaron |
| | 1,86 | " | " | Benzaron |
| b) | 4,49 | " | " | Benzbromaron |
| | 1,88 | " | " | Benzaron |



4.2.8 Nachweis in Blut

Zur Verfügung stand Frischblut, das 2, 4 und 6 Stunden nach einmaliger oraler Applikation von 100 mg Benzbromaron durch Venenpunktion gewonnen wurde. Die Menge war zwischen 6 und 8,1 ml. Das angewandte Verfahren zur Extraktion ist in 4.2.6.1 c und in 4.2.6.5 beschrieben, das zur Propionylierung in 4.2.2.2 und 4.2.6.5.

4.2.8.1 Gaschromatographischer Nachweis

Die gaschromatographische Untersuchung wurde wie in 4.2.2.1 und in 4.2.6.5 durchgeführt. In den Chromatogrammen aller drei Proben konnte ein deutlich sichtbarer Benzbromaronpeak erzielt werden. Eines ist in Abb. 4.13 zu sehen. Für Benzaron wurde kein Peak erhalten. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß der Kurvenverlauf bei der Retentionszeit des Benzbromarons mit einem Achtel der Abschwächung aufgezeichnet ist gegenüber dem bei der Zeit des Phenprocoumons.

Die quantitative Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 4.2.6.5. Die erhaltenen Quotienten aus Benzbromaron- und Phenprocoumonpeak wurden in das dortige Diagramm eingetragen. Anhand der Regressionsgerade konnten die Blutspiegel des Benzbromarons abgelesen werden. Der Maximalwert mit 2,30 µg/ml wurde 4 Stunden nach oraler Verabreichung des Medikaments erreicht. Nach 2 Stunden waren es 1,48 µg/ml, nach 6 Stunden 1,27 µg/ml. Die Werte sind im nachstehenden Diagramm aufgezeichnet (Abb. 4.14).

Abb. 4.13: Chromatogramm von Blut, das 4 Stunden nach oraler Applikation von 100 mg Benzbromaron gewonnen wurde. Stationäre Phase: 3 %ige OV 1 bei 250° C, FID bei 300° C. 4,50 Minuten entspricht Benzbromaron 13,74 " " Cholesterin 2,16 " " Phenprocoumon, das als innerer Standard zugeführt wurde. Benzaron war noch nicht nachweisbar.

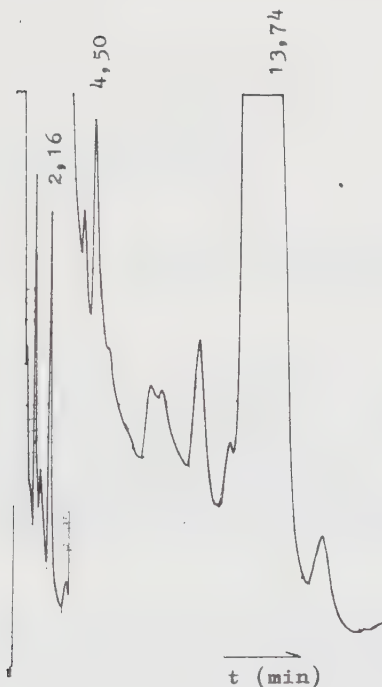
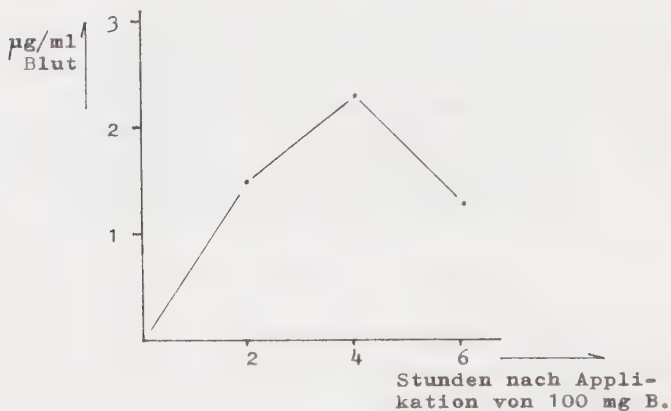


Abb. 4.14: Blutspiegel von Benzbromaron nach einmaliger oraler Applikation von 100 mg



4.2.8.2 Massenspektrometrischer Nachweis

Als Geräte dienten der Massenspektrometer Varian MAT 112, das Spektrosystem MAT 200 und der Gaschromatograph Varian Aerograph Series 1400. Die stationäre Phase war 5 %ige OV 101. Die Injektionstemperatur betrug 200°C , die Säulentemperatur zu Beginn ebenfalls 200°C . Sie wurde um 10°C/min bis 300°C gesteigert und dann bei dieser Temperatur konstant gehalten.

Zunächst wurde propionyliertes Benzbromaron untersucht, das in Äthylacetat (1mg/ml) gelöst war. Abb. 4.15 a zeigt das Chromatogramm. Der Peak nach 1,05 Minuten entspricht dem überschüssigen PSA, der nach 8,76 Minuten dem propionylierten Benzbromaron.

Das Massenspektrogramm des Benzbromaronpeaks (Abb. 4.15 b) zeigt bei einem Massenbruchstück von 57 PSA, bei 80 Brom, bei 264 dehalogeniertes Benzbromaron, nämlich

Benzaron, bei 424 Benzbromaron und bei 480 propionyliertes Benzbromaron. In der Vergrößerung des Abschnittes zwischen den Massenbruchstücken 400 und 500 ist Benzbromaron und seine propionylierte Form genauer dargestellt. Die typische Brombande, die sich von den einzelnen Isotopen ableitet, ist gut erkennbar (Abb. 4.15 c).

Zur Untersuchung des 4 Stunden nach einmaliger oraler Applikation von 100 mg Benzbromaron gewonnenen Blutes wurde dessen propionylierter Extrakt von 4,2.8 verwendet. Im Chromatogramm (Abb. 4.16 a) entspricht der Peak nach einer Retentionszeit von 2,27 Minuten bei der Spektrenzahl 32 dem aus dem Genuß coffeinhaltiger Getränke stammenden Coffein, der Peak bei der Spektrenzahl 104 dem Phenprocoumon und der Peak bei der Spektrenzahl 136 dem Benzbromaron. Das Massenspektrogramm des Benzbromaron-peaks ergibt wie zuvor ein Massenbruchstück von 57 (entspricht PSA), 80 (Brom), 264 (Benzaron) und 424 (Benzbromaron).

Die Verschiebung der Retentionszeit des Benzbromarons im Blut gegenüber der des Arzneimittels in der Äthylacetatlösung ist auf die nicht exakt gleichmäßige Erhitzung des Gaschromatographen während des Temperaturprogrammes zurückzuführen, wobei eine gering höhere Temperatur bereits zu deutlich verkürzten Retentionszeiten führt.

Hiermit ist nachgewiesen, daß der Peak im Blutextrakt, der nach der für Benzbromaron typischen Retentionszeit erzielt wurde, das gesuchte Medikament anzeigt.

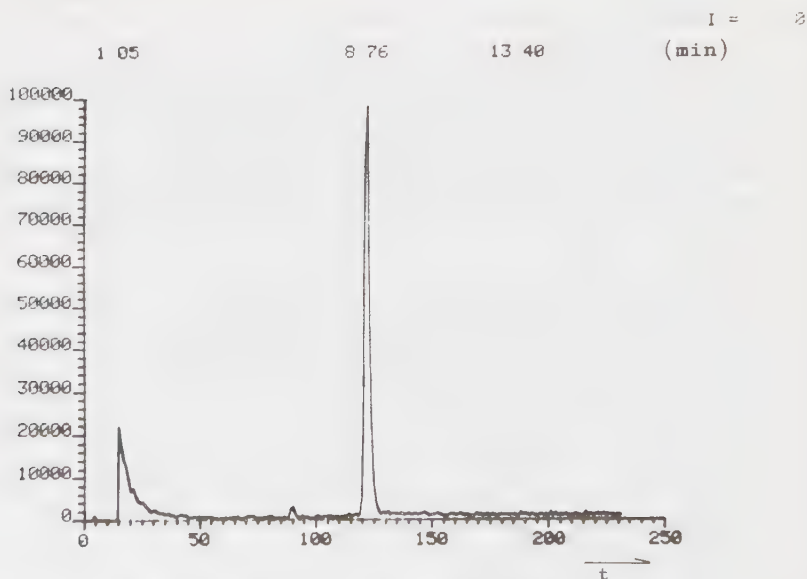
Abb. 4.15 a: Chromatogramm von propionyliertem Benzbromaron. Stationäre Phase: 5 %iges OV 101 von 200 bis 300° C um 10 °C/min ansteigend, anschließend 300° C isotherm. Detektor: MAT 200 Spektrosystem

b und c: Massenspektrogramm des Benzbromaronpeaks (nach 8,76 min). Siehe auch Text.

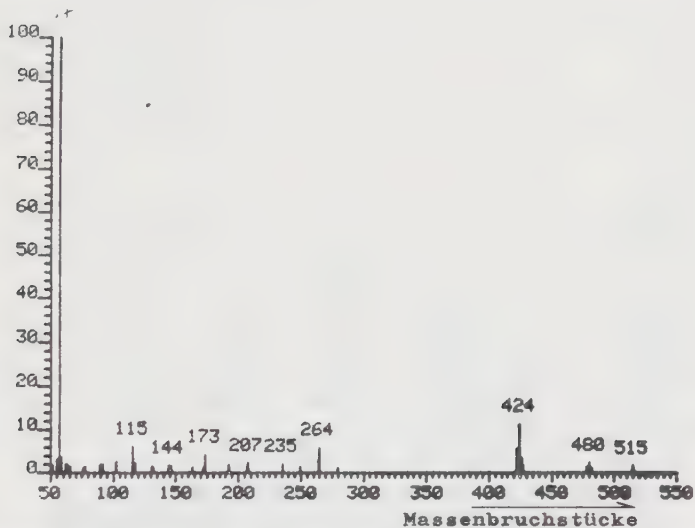
Abb. 4.16 a: Chromatogramm des propionylierten Blutextraktes. Stationäre Phase und Detektor wie in Abb. 4.15. Peak bei 32 entspricht Coffein, bei 104 Phenprocoumon und bei 118 Benzbromaron.

b: Massenspektrogramm des Benzbromaronpeaks. Angaben siehe Text.

4.15 a)

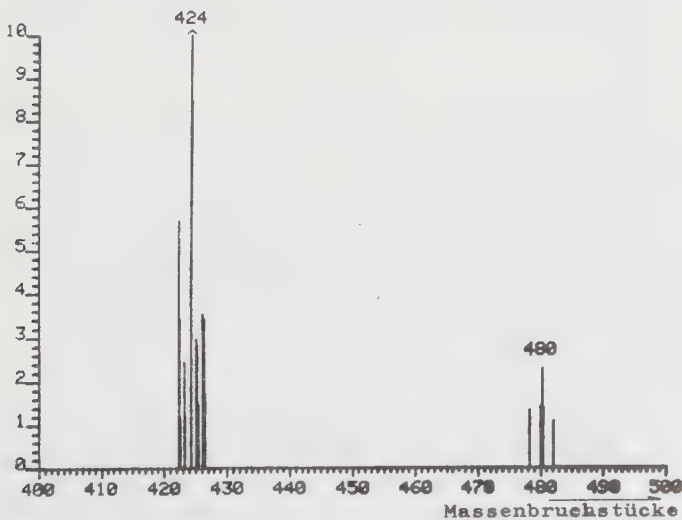


4.15 b)



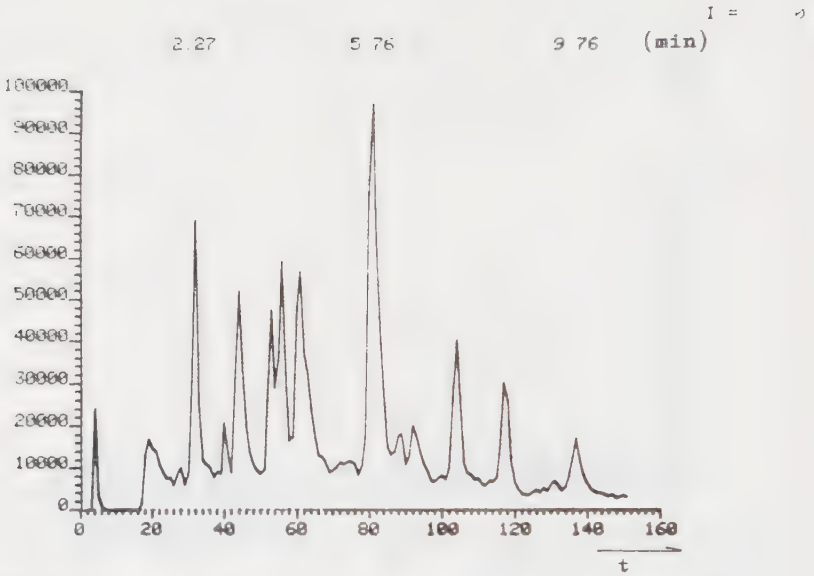
ANALYSIS NAME: BENZ2.DAT SPEC# 123 NORM: B /SCALE: 21532
DATE: MAY 4 79 09:46:53 U1.0

4.15 c)



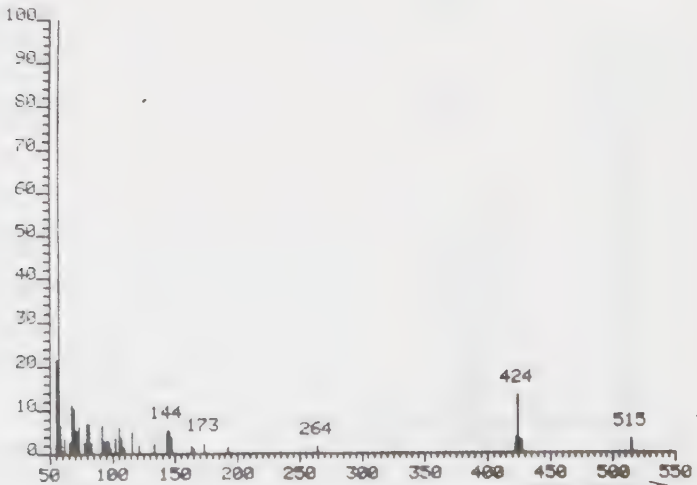
ANALYSIS NAME: BENZ2.DAT SPEC# 123 NORM: B /SCALE: 21532
DATE: MAY 4 79 09:50:45 U1.0

4.16 a)



ANALYSIS NAME: PRO.DAT.1 MAY 4 79 11:07:14 U1.0

4.16 b)



ANALYSIS NAME: PRO.DAT SPEC# 136 NORM: 0 /SCALE: 2216
DATE: MAY 4 79 11:08:22 U1.0

4.2.9 Arbeitsvorschrift

Zur Durchführung ist Blut ab etwa 1 ml, Urin ab etwa 10 ml erforderlich.

4.2.9.1 Untersuchung von Blut

a) Extraktion:

Das Verfahren ist in Abschnitt 4.2.6.5 beschrieben. Das zu untersuchende Blut wird mit etwa der doppelten Menge einer isotonischen Pufferlösung (Phosphat - Puffer, siehe 4.2.6.1 pH 6,5) verdünnt und in ein Schüttelglas gegeben. Als Lösungsmittel kommt die gleiche Menge Chloroform hinzu. Das verschlossene Gefäß wird manuell oder maschinell 5 Minuten geschüttelt. Nach Zentrifugieren kann das Chloroform ausgehoben werden. Der erfaßte Anteil wird aus den Wägungen des eingesetzten und des zurückgewonnenen Lösungsmittels errechnet.

Dem Extrakt werden nun 20 µg Phenprocoumon (am besten in einer Standardlösung, z. B. 10 mg/100 ml Chloroform) als innerer Standard zugegeben.

b) Derivatisierung:

Die Derivatisierung erfolgt nach Kapitel 4.2.2.2. Der Extrakt kommt in ein mit einem Teflonschraubverschluß luftdicht verschließbares Reagenzglas und wird abgedampft. Nach Zugabe von 100 µl Propionsäureanhydrid und 100 µl Pyridin wird das verschlossene Gefäß 20 Minuten in einem Aluminiumblock bei 100° C erhitzt. Dann wird das Reaktionsgemisch wieder abgedampft. Auf Grund der geringen Flüchtigkeit des PSAs ist für die Trocknung eine Vakuumpumpe erforderlich, z. B. eine Wasserstrahlpumpe. Das Derivat muß frei von Wasser bleiben.

c) Gaschromatographische Bestimmung

Die Untersuchungen wurden an einem Gerät der Firma Hewlett Packard 5830 A durchgeführt. Als stationäre Phase wurde 3 %iges OV 1 bei 250° C isotherm gewählt. Die Einspritztemperatur war 270° C, die des Flammenionisationsdetektors (FID) 300° C.

Der propionylierte Rückstand wird in 100 µl Äthylacetat gelöst, bei einem Analysengang werden etwa 1 - 2 µl manuell eingespritzt.

Die Peak-Höhen des Chromatogramms können entweder gemessen oder durch einen angeschlossenen Integrator ausgewertet werden. Der Quotient aus der Peakhöhe des Benzbromarons zu der des Phenprocoumons wird von extrahierten auf den gesamten Anteil des zu bestimmenden Benzbromarons umgerechnet (entsprechend dem zurückgewonnenen und eingesetzten Extraktionsmittel). Mit dem erhaltenen Wert kann nun aus einer Eichkurve die Menge des Medikaments in µg abgelesen werden (4.2.6.5). Diese muß nun noch durch das eingesetzte Blutvolumen dividiert werden, um den Blutspiegel in µg/ml zu erhalten.

4.2.9.2 Untersuchung von Urin

Die Verarbeitung nicht hydrolysierten Urins ist auf Grund der minimalen renalen Ausscheidung freien Benzbromarons nicht sinnvoll. Wie in der Veröffentlichung von Broekhuysen et al. (5) zu sehen ist, bleibt auch die Ausscheidung des glukuronidierten Medikaments gering.

a) Hydrolyse:

Der Urin (ca. 10 - 20 ml) wird mit 20 ml Aqua dest. verdünnt, mit 10 ml konzentrierter Salzsäure (37 %ig) versetzt und unter einem Abzug 30 Minuten auf 100° C erhitzt.

Es ist zu beachten, daß während des Erhitzens immer Flüssigkeit im Glas zurück bleibt, da sonst durch Bildung unlöslicher Komplexe das Ergebnis verfälscht wird.

b) Extraktion:

Nach Neutralisieren der Salzsäure mit NaOH und erneutem leichten Ansäuern wird mit Chloroform extrahiert. Dieser und die weiteren Schritte entsprechen denen der Verarbeitung des Blutes. Die zu erwartenden Mengen des Medikaments sind für eine genaue quantitative Auswertung bei dieser Methode zu gering.

5 Diskussion der Ergebnisse und Zusammenfassung

Das Hauptziel der Untersuchung, ein gemeinsames gaschromatographisches Analysenverfahren für Allopurinol und Benzbromaron aufzustellen, konnte wegen des unterschiedlichen physikalischen und chemischen Verhaltens beider Medikamente nicht erreicht werden.

5.1 Allopurinol

Es konnte weder ein neues, einfacheres Extraktionsverfahren noch ein neues gaschromatographisches Trennverfahren gefunden werden. Als Ursachen sind zu nennen: Die mangelnde Löslichkeit in unpolaren Flüssigkeiten verhindert eine Extraktion durch Ausschütteln oder Extraktionsssäulen. Die Gaschromatographierbarkeit wird durch fehlende Flüchtigkeit und Zersetzen des Medikaments beim Erhitzen (Schmelzpunkt über 350°C) einerseits und durch geringe Reaktionsbereitschaft bei Derivatisierungen andererseits beeinträchtigt. Die durchgeführten Versuche sind im Abschnitt 4.1 aufgeführt.

Die von Miller et al. (26) veröffentlichte Methode der gaschromatographischen Trennung wurde nachvollzogen (4.13). Sie ist nur für reine Allopurinollösungen anwendbar. Zur Aufbereitung von Blut oder Urin wäre deshalb eine aufwendige Trennung durch eine Dünnschichtchromatographie oder eine fraktionierte Trennung mit Ionenaustauscherharzen nötig. Außerdem ist das Verfahren wegen des aggressiven Derivatisierungsmittels Bistri-methylsilyltrifluoracetamid (BSTFA) für den Routinebetrieb weniger geeignet.

An Extraktionsverfahren sind nur die fraktionierte Trennung mit Ionenaustauscherharzen und die Trennung durch Dünnschichtchromatographie bekannt.

Auf Grund der guten Resultate der Hochdruckflüssigchromatographie und der dazu nötigen einfachen Aufbereitung allopurinolhaltiger Proben wird diese wohl im Routinebetrieb die Methode der Wahl sein (3.1.2.7).

5.2. Benzbromaron

Für Benzbromaron sind nur wenige Nachweisverfahren beschrieben. Auch eine gaschromatographische Bestimmung ist darunter.

In dieser Untersuchung konnte ein neues Verfahren gefunden werden, das in einem einfachen und routinefreundlichen Arbeitsgang die gaschromatographische Bestimmung von Benzbromaron aus Blut und Urin ermöglicht. Die Durchführung ist im Kapitel Arbeitsvorschrift (4.2.9) genau aufgeführt. Die Extraktion erfolgt durch Ausschütteln der leicht angesäuerten Probe in Chloroform. Als innerer Standard dient Phenprocoumon. Der abgedampfte Extrakt wird mit Propionsäureanhydrid derivatisiert, wodurch sich eine bessere Trennung erzielen läßt. Als stationäre Phase wurde eine 3 %ige OV 1 - Säulenfüllung gewählt, als Detektor ein Flammenionisationsdetektor. Die gaschromatographische Methode ergibt eine schnelle und genaue Analyse.

Nachweis in Blut:

Verwendet wurde Frischblut, das nach einmaliger oraler Verabreichung von 100 mg Benzbromaron gewonnen wurde. Der gemessene Verlauf der Blutspiegelkurve und der Maximalwert von 2,30 µg/ml Blut 4 Stunden nach Applikation decken sich in etwa mit den bisher bekannten Ergebnissen, wobei die Werte bei Yu (38) teilweise etwas

hoher lagen und der Maximalwert zum Teil früher auftrat. Bei Broekhuysen et al. (5) wurden jedoch konträre Ergebnisse erhalten.

Der Beweis, daß der Peak im Chromatogramm an der Retentionszeit des Benzbromarons der derivatisierte Arzneistoff und keine andere Substanz war, wurde im Massenspektrogramm erbracht. Hierzu wurde Blut verwendet, das 4 Stunden nach Verabreichung von 100 mg Benzbromaron abgenommen wurde.

Nachweis im Faeces:

Dieser Nachweis wurde nicht durchgeführt. Wegen des hohen, nicht resorbierten Anteils von fast 50 % der oralen Dosis (Broekhuysen et al. 5) müßte die Analyse gut ausführbar sein.

Nachweis im Urin:

Die Menge des auf renalem Wege ausgeschiedenen Benzbromarons ist sehr gering (Broekhuysen et al. 5). Wegen der zu kleinen Peaks, die in den Chromatogrammen erzielt werden konnten, erfolgte keine quantitative Auswertung.

Es wurde Urin verwendet, der zwischen der 4. und der 6. Stunde nach oraler Applikation von 100 mg Benzbromaron gesammelt wurde.

Freies Benzbromaron: in 20 ml Urin konnte das Medikament nicht nachgewiesen werden. In einem weiteren Versuch mit 50 ml erschien im Chromatogramm an der Stelle des Benzbromarons ein kleiner Peak.

Glukuronidiertes Benzbromaron: die Glukuronverbindungen wurden sauer hydrolysiert. In der Analyse von 20 ml Urin konnte ein kleiner Benzbromaronpeak und ein größerer Benzaroonpeak nachgewiesen werden.

5.3 Zusammenfassung

Allopurinol: Es wurde nicht derivatisiertes, reines Allopurinol sowie die Derivate nach folgenden Reaktionen verwendet: Propionylierung mit Propionsäureanhydrid in alkalischer, Pyridin- und Triäthylaminphase, Chlorierung mit Thionylchlorid und Derivatisierung mit Pentafluorpropionsäure. Bei der folgenden gaschromatographischen Untersuchung der angeführten Substanzen konnte für Allopurinol im Chromatogramm kein Peak erzielt werden.

Der bereits von Miller et al. (26) beschriebene Nachweis des Medikaments nach vorausgegangener Silylierung mit BSTFA wurde nachvollzogen und entsprach dem von oben genannten Autoren veröffentlichten Ergebnis. Bei den Untersuchungen zur Abtrennung von Allopurinol aus wäßrigen Lösungen konnte wegen der ungünstigen Lösungseigenschaften des Arzneimittels eine einfache Isolierung durch Ausschütteln in unpolare Flüssigkeiten oder Anwendung von XAD 2 Säulchen nicht erreicht werden. Die beiden beschriebenen Verfahren zur Abtrennung sind fraktionierte Säulentrennung und Dünnschichtchromatographie, sie sind nicht durchgeführt worden.

Eine direkte Silylierung eingedampfter Serum- oder Urinproben war wegen der vielen zusätzlichen Substanzen gaschromatographisch nicht auswertbar.

Benzbromaron: Der gaschromatographische Nachweis gelang sowohl für nicht derivatisiertes, gelöstes Benzbromaron als auch für das mit Propionsäureanhydrid propionylierte Medikament. Die Derivatisierung wurde nach Kauert (18) in alkalischer Lösung und in Pyridinphase durchgeführt. Wegen des bei der Untersuchung des

unveränderten Arzneimittels im Chromatogramm auftretenden starken Tailings wurde zur Bestimmung die propionylierte Form vorgezogen. Die Zugabe von Phenprocoumon ermöglichte eine quantitative Auswertung. Zur Abtrennung von Benzbromaron aus wäßrigen Lösungen und biologischen Flüssigkeiten wurden Versuche mit Ausschütteln in unpolare Flüssigkeiten, mit der Verwendung von Extrelutsäulchen oder XAD 2 Säulchen und mit Ultrafiltration unternommen. Als günstigstes Extraktionsverfahren erwies sich das Ausschütteln mit einem mechanischen Rüttler und anschließende Zentrifugation, als günstigstes Lösungsmittel Chloroform, welches unter der wäßrigen Lösung herausgehoben werden kann. Eine zusätzliche Extraktion in eine Natronlauge mit folgendem erneutem Ausschütteln in Chloroform entfernte nur die Substanzen mit langen Retentionszeiten im Chromatogramm aus der Probe und verkürzte damit die Analysendauer. Eine Elimination von Molekülen mit ähnlicher Retentionszeit konnte nicht erreicht werden. Angewandtes Verfahren: Blut konnte direkt eingesetzt werden, Urin wegen des hohen glukuronidierten Anteils des renal ausgeschiedenen Benzbromarons nach vorausgehender saurer Hydrolyse. Die durch Ausschütteln in Chloroform extrahierten Substanzen wurden einer Propionylierung mit PSA zugeführt. Nach Abdampfen des Reaktionsgemisches konnte der in Äthylacetat aufgenommene Rückstand direkt analysiert werden. Gaschromatographischer Nachweis: Als stationäre Phase diente 3 %ige OV 1 bei 250⁰ C, als Detektor ein Flammenionisationsdetektor. Für Benzbromaron konnte ein sehr gut brauchbarer Peak nach etwa 4.30 Minuten erzielt werden. Zur quantitativen Bestimmung wurde als innerer Standard Phenprocoumon zugegeben. 4 Stunden nach einmaliger oraler Applikation von 100 mg Benzbromaron konnte ein

maximaler Blutspiegel von 2,30 µg/ml gemessen werden. Nach 2 Stunden waren es 1,48, nach 6 Stunden 1,27 µg/ml. Zur Kontrolle wurde der entsprechende Peak massenspektrometrisch als Benzbromaronpeak identifiziert.

Im Urin konnte Benzbromaron nur in minimaler, nach Hydrolysierung der Glukuronid-Verbindungen in etwas größerer Konzentration gefunden werden. Zusätzlich war hier der Hauptmetabolit Benzaron nachweisbar.

6 Literaturübersicht

- (1) Europäisches Arzneibuch I/II
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
und GOVI-Verlag, Frankfurt, S. 45, 61, 89 (1976)

- (2) Deutscher Arzneimittelcodex II
Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, Abschnitt
Benzbromaron, (1979)

- (3) AXELSON, M., SJOVALL, J.
Selective liquid chromatographic isolation pro-
cedure for gaschromatographic-massspectrometric
analysis of 3 - ketosteroids in biological
materials
J. Chromatogr. 126, 705, (1976)

- (4) BEARDMORE, T. D., KELLEY, W. N.
Studies on the mechanism of allopurinol-induced
inhibition of pyrimidine metabolism
Clin. Res. 19, 27, (1971)

- (5) BROEKHUYSEN, J., PACCO, M., SION, R.
DEMEULENAERE, L., VAN HEE, M.
Metabolism of benzbromarone in man
Eur. J. Clin. Pharmacol. 4, 125 - 130, (1972)

- (6) BROWN, M., BYE, A.
The determination of allopurinol and oxypurinol
in human plasma and urine
J. Chromatogr. 143, 195 - 202, (1977)

- (7) CHALMERS, R. A., PARKER, R., SIMONDS, H. A.,
SUEDDEN, W., WATTS, R. W. E.
The conversion of 4 - hydroxypyrazolo (3,4-d)
pyrimidine (allopurinol) into 4,6 - dihydroxy-
pyrazolo (3,4-d) pyrimidine (oxypurinol) in
vivo in absence of xanthin-oxygen oxydoreduc-
tase
Biochem. J. 112, 527 - 532, (1969)
- (8) Desitin-Werk Carl Klinke GmbH Hamburg,
Mitteilung über Bleminol, Bleminol 200
- (9) DRYHORST, G., DE, P. K.
A direct electrochemical method for determi-
nation of allopurinol and uric acid mixtures
Anal. Chim. Acta 58, 183 - 191 (1972)
- (10) ELION, G. B.
Enzymatic and metabolic studies with allopurinol
Ann. Rheum. Dis. 25, 608 - 614, (1966)
- (11) ELION, G. B., KOVENSKY, A., HITCHINGS, G. H.,
METZ, E., RUNDLESS, R. W.
Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor
of xanthin oxidase
Biochem. Pharmacol. 15, 863 - 880, (1966)
- (12) ELION, G. B., NELSON, D. J.
Ribonucleotides of allopurinol and oxypurinol
in rat tissues and their significance in
purine metabolism
in SPERLING, O., DE VRIES, A., WYNGAARDEN, J. B.
(Hrsg.)
Adv. Exp. Med. Biol. 41, 639 - 52, (1974)
Plenum Press New York, London

- (13) ELION, G. B., YU, T. F., GUTMAN, A. B.,
HITCHINGS, G. H.
Renal clearance of oxypurinol, the chief metabolite of allopurinol
Am. J. Med. 45, 69 - 77, (1968)
- (14) ENDELE, R., LETTENBAUER, G.
Hochdruckflüssigchromatographische Bestimmung
von Allopurinol und Oxypurinol im Serum
J. Chromatogr. 115, 228 - 31, (1975)
- (15) HANDE, K., REED, E., CHALMER, B.
Allopurinol kinetics
Clin. Pharmacol. Ther. 23, 5, 598 - 605, (1978)
- (16) Henning Berlin GmbH
Foligan, Kausaltherapie bei allen Formen der
Urikopathie
- (17) KAISER, W.
Pharmakologische Hemmung der Purin- und Harnsäuresynthese
in ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W. (Hrsg.)
Gicht
Handbuch der Inneren Medizin VII/3, S. 462,
Springerverlag Berlin, Heidelberg, New York
(1976)
- (18) KAUERT, G.
Isolierung und gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung biogener Amine
des Katecholamin- und Indolalkylaminstoffwechsels aus Urin
Dissertation an der Universität Bonn, (1977)

- (19) KRAMER, W. G., FELDMAN, S.
Aparent metabolism of allopurinol by blood
- a preliminary report
Res. Commun. Chem. Pathol. and Pharmacol. 18,
4, 781 - 4, (1977)
- (20) KRENITZKY, T. A., ELION, G. B., STRELITZ, R. A.,
HITCHINGS, G. H.
Ribonucleosides of allopurinol and oxoallo-
purinol
J. Biol. Chem. 242, 2675 - 82, (1967)
- (21) Labaz GmbH, Düsseldorf
Uricovac M, mehr als Benzbromaron
- (22) LÖFFLER, G.
Stoffwechsel der Purine und Pyrimidine
in HARPER, H. A., LÖFFLER, G., PETRIDES, P. E.,
WEISS, L. (Hrsg.)
Physiologische Chemie, S. 465, Springer-Verlag
Berlin, Heidelberg, New York, (1975)
- (23) MERTZ, D. P.
Gicht - Grundlagen, Klinik, Therapie
Thieme-Verlag Stuttgart, (1973)
- (24) MESSERSCHMID, W., SEITZ, W.
Vergleichende Untersuchungen von Allopurinol
-Präparaten des Handels
Die Krankenhausapotheke 27, 3, 18 - 19, (1977)

- (25) MILLER, V., PACAKOVA, V., SMOLKOVA, E.
Gas-liquid chromatographic analysis of tri-
methylsilyl derivatives of pyrimidine and purine
bases and nucleosides
J. Chromatogr. 119, 355 - 67, (1976)
- (26) MILLER, V., PACAKOVA, V., SMOLKOVA, E.
Gaschromatographic analysis of pharmaceuticals
based on pyrimidine and purine substances
J. Chromatogr. 123, 216 - 19, (1976)
- (27) MÜLLER, M. M., FUCHS, H., PISCHEK, G., BRESNIK,
W.
Purinstoffwechsel und Harnsäurepool bei Gicht-
patienten unter Benzbromarontherapie
Therapiewoche 25, 514, (1975)
- (28) NELSON, D. J., BUGGE, C. L. L., KREMSKY, H. C.,
ELION, G. B.
Formation of nucleotides of (6 - ^{14}C) allopur-
inol and (6 - ^{14}C) oxypurinol in rat tissues
and effects on uridine nucleotide pools
Biochem. Pharmacol. 22, 2003 - 22, (1973)
- (29) British Pharmacopeia
Her Majesty's Stationery Office, London
(1973)
- (30) United States Pharmacopeia XIX
United States Pharmacopeia Convention Inc.
Rockville (1975)

- (31) RODNAN, G. P., ROBIN, J. A., TOLCHIN, S. F.,
ELION, G. B.
Allopurinol and gouty hyperuricaemia, efficacy
of a single daily dose
American Journal of Medicine (JAMA) 45, 1143
- 47, (1968)
- (32) RUNDLESS, R. W., WYNGAARDEN, J. B., HITCHINGS,
G. H., ELION, G. B.
Drugs and uric acid
Ann. Rev. Pharmacol. 9, 345 - 62, (1969)
- (33) SALIM, E. F., MURPHY, J. E.
Qualitative and quantitative tests for allo-
purinol
J. Phar. Sci. 57, 4, 649 - 50
- (34) SIMKIN, P. A.
Polyacrylamide adsorption chromatography of
purines and related compounds
J. Chromatogr. 47, 103 - 7, (1970)
- (35) SIMMONDS, H. A.
Urinary excretion of purines, pyrimidines and
pyrazolopyrimidines in patients treated with
allopurinol or oxypurinol
Clin. Chim. Acta 23, 353, (1969)
- (36) STAHL, E.
Dünnschichtchromatographie, S. 199
Springerverlag Berlin, Heidelberg, New York,
(1967)

- (37) VYCUDILIK, W.
Die Derivatisierung in der gaschromatographischen Analyse
Zeitschrift für Rechtsmedizin 80, 197 - 203,
(1977)
- (38) YU, T. F.
Pharmacokinetic and clinical studies of a new uricosuric agent - benzbromarone
Journal of Rheumatology 3, 3, 305 - 12, (1976)
- (39) ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W., (Hrsg.)
Gicht
Handbuch der Inneren Medizin VII/3
Springerverlag Berlin, Heidelberg, New York,
(1976)

Lebenslauf

Name: Hermann Anton Widmann
geboren: 12.10.1949 in Ingolstadt/Donau
Vater: Hermann Maximilian Widmann, Ingenieur
Mutter: Hilde Maria Widmann, geb. Fleißer,
Kaufmann

1956 - 1960 Volksschule St. Moritz, Ingolstadt
1960 - 1964 Chr. Scheiner Gymnasium, Ingolstadt
1964 - 1967 Ickstatt Realschule, Ingolstadt
1967 Erlangung der mittl. Reife
1967 - 1970 Maschinenschlosserlehre in der Firma
Schubert und Salzer, Ingolstadt
1967 - 1970 Verbandsberufsschule Ingolstadt
1970 Gesellenprüfung als Maschinenschlosser
vor der Industrie- und Handelskammer
Oberbayern
1970 - 1973 Studium an der Fachhochschule München,
Fachbereich Maschinenbau
1973 Graduierung als Maschinenbauingenieur
1973 - 1974 Ziviler Ersatzdienst in der Privatklinik
Dr. Rudschies, Ingolstadt
1974 - 1980 Studium an der Ludwig Maximilians-Uni-
versität, München, Fachbereich Medizin
1976 Ärztliche Vorprüfung
1977 I. ärztliche Staatsprüfung
seit 1977 Doktorand bei Prof. Dr. W. Spann am
Institut für Rechtsmedizin der Univer-
sität München
1979 II. ärztliche Staatsprüfung
1980 III. ärztliche Staatsprüfung
1980 Approbation als Arzt
seit 1981 tätig als Assistenzarzt am Kreiskranken-
haus Ehingen/Donau, chirurgische Abtei-
lung

